

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean-Jacques PÉREZ

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'Étude de la solubilité des Protéïdes.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1939, devant la Commission d'examen.

MM. JAVILLIER, *Président.*

AUBEL	}	<i>Examineurs.</i>
WURMSER		

PARIS

HERMANN & C^{ie}, ÉDITEURS
6, rue de la Sorbonne

1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire . . . M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe

Professeurs honoraire



H. LEBESGUR.
Emile PICARD.
Léon BRILLOUIN.
GUILLET.
PÉCHARD.
FREUNDLER.
AUGER.
DANGEARD.

LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD.
LAPICQUE.
G. BERTRAND
ABRAHAM.

Ch. FABRY.
Léon BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSCQ.
BOHN.
RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY . . . T	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	H. BÉGHIN . . . T	Mécanique physique et expérimentale.
Emile BOREL . . . T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
Jean PERRIN . . . T	Chimie physique.	PAUTHENIER . . .	Physique (P. C. B.).
E. CARTAN T	Géométrie supérieure.	De BROGLIE . . . T	Théories physiques.
A. COTTON T	Recherches physiques.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
J. DRACH T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	P. JOB	Chimie générale.
Charles PÉREZ . . . T	Zoologie.	LABROUSTE . . .	Physique du Globe.
M. GUICHARD . . . T	Analyse et mesures chimiques.	PRENANT T	Anatomie et histologie comparées.
Paul MONTEL . . . T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM . . T	Botanique.	COMBES T	Physiologie végétale.
G. JULIA T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GARNIER T	Mathématiques générales.
C. MAUGUIN T	Minéralogie.	PÉRÈS	Mécanique théorique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY . . T	Pétrographie.	HACKSPILL T	Chimie minérale.
N	Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER T	Physiologie générale.
A. DENJOY T	Application de l'analyse à la Géométrie.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
L. LUTAUD T	Géographie physique et Géologie dynamique.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH . . . T	Physique.	G. RIBAUD T	Hautes températures.
G. BRUHAT T	Physique théorique et Physique céleste.	CHAZY T	Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS T	Enseignement de Physique.	GAULT	Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE . . . T	Physique générale et Radioactivité.	CROZE	Recherches physiques.
A. DUFOUR T	Physique (P. C. B.).	DUPONT T	Théories chimiques.
L. DUNOYER	Optique appliquée.	LANQUINE T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND . T	Botanique.	VALIRON	Mathématiques générales.
M. JAVILLIER . . . T	Chimie biologique.	BARRABÉ	Géologie structurale et géologie appliquée.
ROBERT-LÉVY . . . T	Physiologie comparée.	MILLOT	Biologie animale (P. C. B.).
F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	F. PERRIN	Théories physiques.
Henri VILLAT . . . T	Mécanique des fluides et applications.	VAVON	Chimie organique.
Ch. JACOB T	Géologie.	G. DARMOIS . . .	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
P. PASCAL T	Chimie générale.	CHATTON T	Biologie maritime.
M. FRÉCHET T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	AUBEL	Chimie biologique.
E. ESCLANGON . . . T	Astronomie.	J. BOUQUART . . .	Géographie physique et Géologie dynamique.
M ^{me} RAMART-LUCAS . T	Chimie organique.	M ^{me} JOLIOT-CURIE .	Physique générale et Radioactivité.
		PLANTEFOL	Biologie végétale (P. C. B.).
		CABANNES	Enseignement de Physique.
		GRASSÉ	Biologie animale (P. C. B.).
		PRÉVOST	Chimie (P. C. B.).
		BOULIGAND	Mathématiques.
		CHAUDRON	Chimie (P. C. B.).

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire . . . D. TOMBECK.

A L'INSTITUT PASTEUR

A M. LE PROFESSEUR JAVILLIER

Membre de l'Institut

Avec un sentiment très profond de respect et de reconnaissance.



Introduction.

L y a très peu de temps encore, on croyait pouvoir expliquer les propriétés physico-chimiques des protéides — et même certaines particularités de la matière vivante — par une théorie colloïdale.

Cette conception est presque complètement abandonnée aujourd'hui et l'idée que les propriétés des protéides doivent s'expliquer par les théories classiques de la chimie générale s'impose chaque jour davantage.

La notion de colloïde, introduite dans la science par GRAHAM, en 1862, a connu une fortune remarquable et peut-être excessive. Cette notion, purement empirique à son origine, a été le point de départ de vastes théories qui avaient en commun de vouloir établir une différence fondamentale entre deux catégories de substances, les cristalloïdes et les colloïdes. Les premières donnaient avec l'eau des solutions vraies auxquelles s'appliquaient les lois de la chimie-physique ; les autres donnaient des solutions dont les propriétés, *a priori* très différentes, ne pouvaient s'expliquer que par une chimie-physique particulière : ainsi est née la chimie colloïdale.

Les deux conceptions — cristalloïdes et colloïdes — n'étaient peut-être pas en réalité aussi éloignées qu'on pourrait le croire à première vue et leur principale opposition résidait surtout, semble-t-il, dans la terminologie. Si, d'ailleurs, on a beaucoup utilisé le terme de « colloïdal », on n'en a pas toujours suffisamment précisé le sens. Il n'a même été

bien souvent qu'une manière commode de masquer notre ignorance.

Au vrai, que faut-il comprendre, en général, par ce terme assez vague de « colloïdal » et, en particulier, quand on l'applique aux protéïdes ? Sur quoi repose cette distinction entre solutions colloïdales et solutions vraies ou cristalloïdes ? Faut-il comprendre par solution colloïdale une solution de grosses molécules, ionisées ou non, qui diffusent lentement, ne dialysent pas et présentent des propriétés optiques particulières (phénomène de Tyndall), ensemble de propriétés qui dépendent précisément de la grosseur des molécules. Dans ce cas, il est incontestable que les protéïdes forment des solutions colloïdales.

S'agit-il plutôt, comme l'admettent beaucoup d'auteurs, de fausses solutions dont la dispersion ne correspond qu'à un état d'équilibre métastable évoluant spontanément vers la floculation ? Ce point de vue manque de précision et ne saurait être défini d'une façon expérimentale. La stabilité et la métastabilité sont des définitions purement thermodynamiques et, en partant simplement du deuxième principe, l'expression finale de toute solution est la floculation.

S'agirait-il, alors, d'une question purement quantitative, les solutions colloïdales floculant plus vite que les solutions vraies ? Dans ce cas, la plupart des solutions aqueuses de protéïdes ne pourraient être considérées comme des solutions colloïdales car leur stabilité est, en général, très grande.

La stabilité, au lieu d'être considérée dans le temps, pourrait l'être par rapport à certains facteurs physiques. Ainsi, par exemple, les solutions de protéïdes, comme les solutions de colloïdes artificiels, floculent sous l'influence de la chaleur tandis que la plupart des solutions vraies ne floculent pas. Cette distinction entre solutions vraies et solutions colloïdales n'est cependant pas admise car la floculation des protéïdes par la chaleur ne paraît pas dépendre simplement de changements physiques, mais bien de modifications chimiques de la phase dispersée, modifications qui conduisent à un nouveau corps insoluble ou peu soluble : le *protéïde dénaturé*.

En général, est appelée « colloïdale » toute solution dont la phase dispersée est formée de particules relativement

grosses. Il n'y a pas d'inconvénient à employer le terme dans ce sens. Mais il faut alors distinguer parmi ces solutions les *colloïdes hydrophiles* et les *colloïdes hydrophobes* (1), la distinction entre ces deux groupes de particules étant basée sur leur différence de stabilité en présence des sels neutres : les colloïdes hydrophiles ne précipitent que par un excès de sels neutres — ce sont essentiellement les solutions aqueuses de protéïdes et de polyosides — ; tandis que les colloïdes hydrophobes précipitent en présence de quantités relativement faibles de sels neutres — ce sont les sols artificiels, en particulier les hydrosols métalliques.

Le problème colloïdal peut être envisagé sous un autre aspect : celui d'une discrimination entre dispersion moléculaire et dispersion micellaire. Une solution colloïdale serait une dispersion micellaire tandis qu'une solution vraie serait une dispersion moléculaire. Pour qu'une telle division ait de la valeur il faudrait d'abord savoir distinguer un polymère de molécules d'une micelle ou une association moléculaire d'une micelle. Faudra-t-il, ici encore, chercher cette distinction dans la stabilité ? Le polymère et l'association moléculaire étant des édifices plus stables que la micelle ? Ou même, faudra-t-il se contenter d'invoquer une plus ou moins grande complexité du système ? Au vrai, aucune méthode expérimentale ne permet actuellement de fixer une limite précise entre le domaine micellaire et le domaine moléculaire. Pour le faire, il faudrait probablement pouvoir expliquer la nature des forces qui agissent pour réunir les molécules entre elles. Une telle explication est, pour l'instant, illusoire.

Au problème des micelles, une question est étroitement liée : la théorie de la couche électrique double d'HELMHOLTZ (2). Cette couche interviendrait dans la dispersion des micelles, tandis que la solubilité des électrolytes peu solubles dépendrait de l'ionisation. Il paraît difficile de donner une

(1) Peut-être s'agit-il d'une différence plus importante qu'on ne pourrait le penser au premier abord. En effet, d'autres propriétés que la stabilité sont différentes dans les deux groupes, par exemple la viscosité.

Cependant, du point de vue de la chimie-physique générale, nous ne voyons aucun caractère fondamental de distinction.

(2) Cette théorie est clairement exposée par J. PERRIN, *Journ. de Chimie-physique*, 2, 601 (1904) ; 3, 50 (1905).

base expérimentale solide à une pareille distinction puisque, en définitive, toute électrisation est d'origine électronique. Même théoriquement, comment pourrait-on établir où finit l'électrisation de contact et où commence l'ionisation ? Dans les deux cas, on sera finalement conduit à admettre un transport électronique et ce n'est pas de l'appeler tantôt modification des orbites électroniques de l'atome, tantôt réaction chimique qui changera la chose.

En résumé, le seul fait précis qui devrait être invoqué pour établir une distinction entre solutions colloïdales et solutions cristalloïdes est la taille des particules dispersées. Cette conclusion est particulièrement légitime dans le cas des solutions aqueuses de protéides.

De ce qui précède, il ne faudrait cependant pas conclure qu'il n'existe aucune différence entre les protéides et les cristalloïdes ordinaires. Les protéides ont, au contraire, des caractères très particuliers qui les différencient à la fois des cristalloïdes et des colloïdes ; mais ces caractères dépendent seulement de leur constitution chimique, de leur structure moléculaire, de leur labilité, de leur complexité du point de vue physico-chimique (électrolytes polyvalents). Il n'est pas besoin d'une « chimie colloïdale », même d'une chimie colloïdale particulière pour expliquer ces propriétés.

La chimie-physique classique des solutions paraît être l'unique domaine où se rangeront un jour les solutions aqueuses de protéides. Et ceci est probablement vrai non seulement pour les solutions de protéides, mais encore pour toutes les solutions colloïdales. Avec les progrès de la science, il est à prévoir que toute distinction physico-chimique d'ordre général entre solutions vraies et solutions colloïdales est appelée à disparaître.

Dans ce qui va suivre, nous nous proposons d'appuyer cette opinion sur un exemple précis : la solubilité des protéides.

Avant cet exposé, je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur MACHEBŒUF qui fut mon premier maître à l'Institut Pasteur et à remercier mon ami G. SANDOR pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de ce travail.

Aperçu historique.

Influence des sels neutres sur la solubilité des protéides.

Au début de l'histoire physico-chimique des protéides, on a pensé qu'il existait une différence très nette entre la dissolution des protéides et celle d'une substance chimique simple comme le sucre ou le sel marin. On retrouve d'ailleurs la trace de cette manière de voir dans certains termes encore utilisés aujourd'hui. Suivant cette conception, la dissolution des protéides serait une « *peptisation* » dépendant d'un phénomène de « *solvatation* », c'est-à-dire qu'elle résulterait d'une imbibition et d'un gonflement exagéré d'un gel protéidique aboutissant finalement à l'éclatement de ce gel et à son morcellement en particules suffisamment ténues pour former des suspensions stables. Ce sont surtout les « colloïdo-chimistes » qui ont employé ces termes avec l'idée de rapprocher, sinon de confondre, les colloïdes artificiels et les protéides. Ainsi, on les trouve souvent dans les traités et publications de ZSIGMONDY, FREUNDLICH, WO. OSTWALD. Il est juste d'ajouter que les colloïdo-chimistes n'ont pas eu l'exclusivité de ces termes et qu'il n'est pas rare de les voir utilisés par des spécialistes de la chimie-physique des protéides, HANDOWSKY par exemple.

En fait, la dissolution et la peptisation sont-elles deux phénomènes distincts ? Ce que l'on a appelé la peptisation des protéides, diffère-t-elle réellement de la dissolution ? De nombreux auteurs ont voulu l'établir ; mais, d'emblée, ils entrevoyaient que, en tout cas, les conceptions colloïdales devraient être modifiées avant de pouvoir s'appliquer aux

protéides et, progressivement, la chimie-physique des protéides tendait à se dégager complètement de la chimie colloïdale et à former un chapitre à part. En particulier, pour la question de la solubilité, des considérations théoriques et surtout de nouvelles méthodes expérimentales modifiaient entièrement nos connaissances à ce sujet et donnaient une nouvelle orientation aux recherches.

Mais, quoi qu'il en soit, qu'il s'agisse d'une peptisation ou d'une dissolution vraie, il fallait avant tout, pour ces études, fractionner les solutions de protéides naturels et tâcher d'en isoler des composés qui puissent, éventuellement, correspondre à des espèces chimiques. Aussi, les premiers travaux sur la solubilité des protéides se confondent-ils avec l'étude de leur préparation. L'isolement de ces corps extrêmement fragiles ne pouvait se faire que dans des conditions très particulières. Les seules méthodes classiques qui paraissaient s'appliquer aux protéides étaient celles utilisées pour le fractionnement des alcaloïdes ou des bases complexes ; mais, dans le cas des protéides, elles conduisaient le plus souvent à des précipités tout à fait insolubles à partir desquels il était impossible de récupérer les substances originelles. Cependant, on n'a pas tardé à s'apercevoir qu'on pouvait précipiter certains protéides par dialyse contre de l'eau distillée ou par dilution (1), c'est-à-dire par des procédés qui diminuaient au delà de certaines limites la teneur en sels neutres des solutions protéidiques. Les précipités ainsi obtenus pouvaient être dissous à nouveau dans une solution saline et les nouvelles solutions paraissaient avoir les mêmes propriétés que les solutions protéidiques initiales. A la suite de ces constatations, on a été conduit à une première distinction entre les différents protéides : on a appelé « *globulines* » (2) les protéides insolubles dans l'eau dépourvue d'une certaine quantité d'électrolytes et « *albumines* » les protéides solubles dans l'eau distillée.

(1) PANUM, *Virchow Archiv.*, 3, 1, 251 (1851).

(2) Cette division serait due à PANUM. Le terme de globuline paraît avoir été introduit par A. SCHMIDT qui croyait que ces substances naissent des globules pendant la coagulation : REICHTERS u. DU BOIS-RAYMOND, *Archives* (1862).

Ainsi, le premier essai de classification des protéides reposait sur des considérations de solubilité ; cette propriété s'affirmera par la suite comme prépondérante dans l'étude de ces substances.

Une autre méthode de fractionnement utilisée ultérieurement était encore basée sur cette même propriété physique : les protéides précipitent en présence de très fortes concentrations de certains sels et, tout comme dans le cas de la dialyse, les précipités obtenus se dissolvent facilement dans l'eau distillée, au moins dans la plupart des cas (1), (2), (3), (4), (5).

Au point de vue pratique, il était fondamental de préciser les conditions de la précipitation et les études qualitatives furent peu à peu remplacées par des études quantitatives, par la recherche de constantes de solubilité. Résoudre ce problème était d'ailleurs tout à fait insuffisant, il fallait savoir aussi ce qu'étaient exactement les fractions précipitées par les sels neutres ou la dialyse, car l'intérêt d'isoler des corps ne serait pas grand s'il était impossible de les caractériser. Était-on en présence de composés chimiques définis isolés à partir d'un mélange ou de fractions arbitraires séparées d'autres constituants de même espèce ? Enfin, les protéides précipités par ces techniques avaient-ils conservé intégralement leurs propriétés primitives ?

La première étude systématique de ces questions fut entreprise par HOFMEISTER (6) et ses élèves à la fin du siècle dernier. Ces auteurs étudièrent d'abord l'influence de la concentration saline sur la précipitation des protéides, particulièrement des protéides sériques. Ils constatèrent que la

(1) Les protéides isolés par dialyse se dissolvaient dans des solutions salines tandis que ceux précipités par les sels neutres se dissolvaient dans l'eau pure. Ce qui est naturel puisque les protéides précipités ont évidemment entraîné une partie du sel employé pour la précipitation.

(2) PANUM, *Arch. Path. Anat.*, IV, 419, 1852.

(3) Cl. BERNARD in ROBIN et VERDEIL, *Traité de Chimie anatomique*. Paris, 299, 1853.

(4) VIRCHOW, *Arch. Path. Anat. u. Physiol.*, IV, 572, 1854.

(5) DENIS, *Mémoire sur le sang*, 1859.

(6) HOFMEISTER, *Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, 24, 247 (1887-88) ; *Zeit. Physiol. Chem.*, 14, 165 (1890).

précipitation varie continuellement en fonction de la concentration saline dans certaines zones de concentration et qu'elle reste sensiblement constante dans d'autres zones.

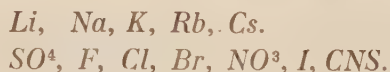
A priori, l'existence de telles discontinuités dans des courbes de solubilité peut avoir des causes variées, surtout quand il s'agit de systèmes aussi complexes que les protéides. Cependant, faute d'autres caractéristiques, il était naturel et même légitime de définir certaines fractions protéidiques précisément par la limite de la concentration saline précipitante. Et l'on retrouve ici le terme de « globuline » pour désigner la fraction protéidique insoluble dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation, sans que l'on ait précisé d'ailleurs s'il s'agissait de la même fraction que celle isolée par dialyse.

L'école de HOFMEISTER essaya ensuite de vérifier si la précipitation par les sels neutres ne modifie pas les protéides et ils conclurent que la précipitation par les sels à concentration élevée est un phénomène réversible.

Ces auteurs montrèrent enfin que la précipitation ne dépend pas seulement de la concentration saline, mais encore de la nature du sel précipitant. Et ceci les conduisit à établir des séries caractéristiques appelées par la suite « séries d'ions d'Hofmeister ». Ces séries étaient obtenues de la façon suivante : si l'on compare des sels qui ont le même anion et des cations variables, on peut établir une série de cations dont le pouvoir précipitant diminue d'un terme au suivant et cette série est la même quel que soit l'anion choisi.

Inversement, avec des sels ayant même cation et des anions variables, on obtient une série d'anions.

Voici, d'ailleurs, les séries obtenues par HOFMEISTER :



La considération de ces séries montre, en outre, qu'il existe une relation évidente entre la solubilité de ces ions dans l'eau et leur pouvoir précipitant : *les ions les plus solubles ont le pouvoir précipitant le plus élevé.*

Cette relation conduisit HOFMEISTER à émettre une hypothèse qui se rapprochait singulièrement des hypothèses mé-

caniques modernes sur la nature de la dissolution en général. Il pensait que la dissolution des protéides dans l'eau et la stabilité de leur dispersion aqueuse étaient dues à la formation de couches d'hydrates stabilisantes, chaque micelle protéidique étant complètement entourée de molécules d'eau de combinaison.

L'action des sels dépendrait alors de leur « hydrophilie », il y aurait en quelque sorte une concurrence entre les protéides et les sels à l'égard du solvant et, en présence d'un excès de sel suffisamment hydrophile, les micelles protéidiques perdraient leur couche d'eau stabilisante au profit du sel. La floculation résulterait de cette déshydratation. Cette hypothèse, de tendance anthropomorphique, était soutenable *a priori* ; mais elle ne s'est montrée, pratiquement, d'aucune fécondité.

Ce qui était le plus original dans l'hypothèse d'HOFMEISTER, au moins à son époque, c'est qu'elle voulait établir une distinction entre la dissolution des protéides et celle des cristalloïdes — mais, par un curieux paradoxe, l'hypothèse proposée par HOFMEISTER pour expliquer la dissolution des protéides est précisément l'hypothèse actuelle la plus classique pour expliquer la dissolution aqueuse en général. Car, parler de couches d'hydrates stabilisantes autour de la micelle protéidique, cela revient à dire qu'il y a union entre les molécules protéidiques et les molécules ou les ions de l'eau : la théorie de la solvation n'est pas autre chose. Vraie ou fausse, la théorie d'HOFMEISTER avait au moins le mérite d'être la première qui ait été proposée pour expliquer la précipitation des protéides par les sels neutres et leur dispersion aqueuse.

D'autres auteurs, cependant, cherchèrent une explication dans un autre sens en partant de l'idée qu'aucune différence fondamentale ne devait séparer les protéides des cristalloïdes. Conformément aux idées alors en cours sur l'état des sels dissous, ces auteurs pensèrent que la dissolution et la précipitation des protéides pouvaient dépendre de réactions chimiques unissant l'anion ou le cation du sel avec un ion pro-

téidique de signe contraire. Jacques LOEB (1) et Wo. PAULI (2) furent les principaux défenseurs de cette théorie ; théorie qui revient, en somme, à appliquer la loi de dilution d'OSTWALD aux protéides (3). Dans le cas de la précipitation des protéides par les sulfates, par exemple, ces auteurs admettent la formation d'un complexe réversible et dissociable, le sulfate de protéide, suivant la réaction :



D'après la loi de dilution d'OSTWALD, la solubilité d'un tel complexe peu soluble dépend de son degré de dissociation. Puisque celle-ci diminue quand la concentration en ions sulfates augmente, le protéide doit précipiter dans ces conditions. Il est à remarquer, d'ailleurs, que, si l'on admet la formation de complexes salins, on peut en tirer d'autres conclusions. On peut admettre, au contraire, que c'est précisément le complexe qui est soluble et expliquer ainsi la dissolution de certains protéides par des sels, par des acides ou par des bases (globulines végétales et euglobulines animales).

Les conceptions d'HOFMEISTER et de LOEB constituaient deux extrêmes. On a beaucoup discuté à leur sujet, sans grand résultat semble-t-il.

Les travaux de HARDY et MELLANBY, travaux continués et complétés par CHICK, puis par SÖRENSEN et par COHN placent la question dans une nouvelle voie. Ces auteurs se sont presque exclusivement maintenus sur le terrain expérimental. La

(1) J. LOEB, *Les Protéines*. Alcan, Paris, 1924 ;

La théorie des phénomènes colloïdaux. Alcan, Paris, 1925.

(2) PAULI, *Beitr. f. exp. Phys. u. Pharm.*, 6, 233 (1905).

(3) La loi de dilution d'OSTWALD est une application de la loi d'action de masse à la théorie d'ARRHÉNIOUS. Considérons une substance AB qui se dissocie suivant la réaction :



en appliquant la loi d'action de masse à cette réaction, on peut écrire:

$$\frac{(A^+) \times (B^-)}{(AB)} = K$$

K est la constante de dissociation. Les lettres entre crochets représentent les concentrations. Cette loi n'est bien vérifiée qu'avec les électrolytes faibles. Dans le cas des électrolytes forts, il faut remplacer les concentrations par les « activités ».

discussion purement théorique du problème n'était sans doute pas inutile, mais, vu l'état de la question à cette époque, il était infiniment plus important de recueillir et de préciser de nouveaux faits expérimentaux grâce auxquels il serait possible d'établir des lois empiriques dont l'interprétation pouvait être considérée comme secondaire ou, tout au moins, réservée pour l'avenir.

À côté de quelques considérations générales, considérations dans lesquelles entrent des questions de couche électrique double, d'hydratation, d'ionisation, HARDY (1) (2) puis MELLANBY (3) notent quelques observations précises et d'un grand intérêt. Ils étudient particulièrement la dissolution de l'euglobuline sérique par les sels neutres et cherchent à déterminer les paramètres exacts du phénomène, autant que ceux-ci peuvent être déterminés, c'est-à-dire dans la mesure où le phénomène peut être reproduit quantitativement. Les courbes de solubilité obtenues avec une euglobuline donnée, dans des conditions données, sont bien reproductibles — le phénomène paraît donc être réversible, au moins dans une certaine mesure. Mais on ne peut obtenir la même courbe de solubilité avec deux préparations euglobuliniques différentes quoique ces globulines aient été préparées de façon identique et que la détermination de leur solubilité soit faite dans les mêmes conditions expérimentales (4) (MELLANBY).

Quelques phénomènes, cependant, sont tout à fait constants :

- 1° le pouvoir dissolvant des ions de même valence est sensiblement constant et indépendant de la nature de ces ions ;
- 2° le pouvoir dissolvant d'ions de valence différente est directement proportionnel au carré de leur valence.

Ces faits notés par MELLANBY, ont une importance capitale

(1) HARDY, *Proc. of the Roy. Soc.* (séries B), 66, 110 (1900).

(2) HARDY, *The Jour. of Physiol.*, 33, 251 (1905).

(3) MELLANBY, *The Jour. of Physiol.*, 33, 338 (1905).

(4) Un tel fait peut recevoir différentes explications. Il pourrait s'agir, par exemple, d'un mélange en proportions variables de plusieurs constituants. Et certains auteurs ont pensé que les euglobulines de MELLANBY étaient mélangées à des nucléoprotéides ; mais ce n'était pas le cas.

dans l'histoire physico-chimique des protéides. Nous les retrouverons quelques années plus tard comme conclusions générales de l'étude de l'influence des sels neutres sur la solubilité des électrolytes cristalloïdes peu solubles (LEWIS).

Dans ce même travail, MELLANBY a exposé d'autres faits d'importance secondaire, mais qui méritent néanmoins d'être mentionnés. Ils seront d'ailleurs repris et confirmés ultérieurement par CHICK et MARTIN. MELLANBY cherchait à définir une constante de solubilité pour un protéide donné, l'euglobuline et, comme nous l'avons déjà vu, ceci ne paraissait pas possible puisque cette solubilité varie, toutes choses égales d'ailleurs, avec les préparations d'euglobulines utilisées.

Mais il existe une particularité qui distingue nettement la solubilité de l'euglobuline dans les solutions salines diluées de la solubilité d'une espèce chimique : lorsque l'on place une même euglobuline en quantité variable, toujours en excès, en présence d'une même solution saline, à la même température, la solubilité finale est approximativement proportionnelle à la quantité totale d'euglobuline du mélange initial (1). Du point de vue de la thermodynamique, ce fait serait une preuve formelle contre l'hypothèse que l'euglobuline est un composé chimique défini.

Quelques années plus tard, CHICK (2) (3) reprend les travaux de MELLANBY et obtient essentiellement les mêmes résultats. Notons, en passant, que l'on trouve chez cet auteur une certaine tendance à attribuer des propriétés d'ordre colloïdal aux solutions de protéides. C'est ainsi qu'elle adopte une idée déjà émise par HARDY et suivant laquelle les euglobulines seraient un complexe de pseudo-globulines et de phosphatides (4). Cette idée qui revient, en somme, à faire jouer un rôle aux « impuretés » dans la solubilité des protéides se renouvelle de temps à autre. Elle avait été adoptée par HAMMARSTEN (5). Son principal avantage est de pouvoir

(1) « La quantité de globuline dissoute par un pourcentage donné de sel neutre est directement proportionnelle à la concentration de la suspension originale de globuline. » MELLANBY, *The Jour. of Phys.*, 33, 338 (1905).

(2) CHICK, *Bioch. Journ.*, 7, 318 (1913).

(3) CHICK et MARTIN, *Bioch. Jour.*, 7, 380 (1913).

(4) CHICK, *Bioch. Jour.*, 8, 404 (1914).

(5) HAMMARSTEN, *Ergebnisse der Physio.*, 1, 330 (1902).

tout expliquer et c'est d'ailleurs aussi ce qui en fait la faiblesse. Elle fut, d'ailleurs, complètement infirmée par la suite.

Les travaux de SÖRENSEN (1) et ses élèves sur l'ovalbumine cristallisée apportèrent à l'étude de la solubilité des protéides une contribution très importante qui orienta cette question dans une direction toute neuve. Reprenant l'étude de la solubilité en présence de fortes concentrations salines, SÖRENSEN cherche à déterminer une constante de solubilité. Cette entreprise se heurtait à de nombreuses difficultés que, par un travail expérimental tout à fait remarquable, SÖRENSEN parvint à surmonter. Il put ainsi établir une équation donnant, avec des paramètres précis, la solubilité d'une ovalbumine cristallisée quelconque. Les variables de cette fonction sont la concentration en sel neutre et le pH . La solubilité du protéide est une fonction logarithmique simple de ces variables et se résout à l'aide de trois constantes seulement :

$$\text{Log } s = -0,22 + 5,41 + 1,7 (pH - 4,90)$$

Dans les premiers travaux de SÖRENSEN, l'ovalbumine cristallisée paraît donc se comporter comme une espèce chimique ; mais, par la suite, il fallut apporter quelques restrictions à cette conclusion. En réalité, la solubilité dépend, très faiblement d'ailleurs, de la quantité totale d'ovalbumine en excès dans la solution saturée. Ainsi, on retrouve pour l'ovalbumine cristallisée ce fait curieux observé pour la première fois par MELLANBY avec l'euglobuline du sérum. Avec d'autres protéides que l'ovalbumine cristallisée, les efforts de SÖRENSEN et ses collaborateurs furent plus décevants : la sérum-albumine cristallisée, les globulines sériques, la caséine, la gliadine... se comportaient toutes comme des mélanges complexes et l'isolement d'une espèce chimique à partir de ces mélanges ne fut pas possible. Pour SÖRENSEN, ce fait ne dépendrait pas tant de la complexité du système que de la facilité avec laquelle les constituants des protéides, les polypeptides, réagissent entre eux. Les protéides seraient

(1) SÖRENSEN, *C. R. Lab. de Carlsberg*, t. 12 (1915-1917) ; t. 18, n° 5, p. 1 (1930-31).

constitués, selon lui, par des mélanges de polymères de quelques polypeptides fondamentaux qui réagiraient les uns avec les autres en formant un système réversible et dissociable dans lequel la proportion relative des différents constituants varierait continuellement avec les variations de concentration, de température, de *pH*, etc... Cette conclusion était basée principalement sur l'étude de la solubilité des différents protéides en fonction de la quantité totale du protéide mis en excès dans la solution saturée.

Si les travaux de SÖRENSEN n'ont pas donné tous les résultats qu'en espérait leur auteur, ils ont néanmoins permis d'établir la première loi de solubilité des protéides, loi d'une application quasi générale aux solutions de ces substances en présence d'un excès de sels neutres.

Les recherches de SÖRENSEN furent reprises par COHN (1) et ses collaborateurs dans une longue série de travaux dont la plupart mériteraient d'être cités. Ces auteurs étudient surtout la solubilité en fonction de la concentration saline et n'accordent que peu d'attention à l'influence du *pH*. Ils retrouvent, tout d'abord, la formule de SÖRENSEN :

$$\text{Log } S = b - K's \mu$$

formule qui, comme nous l'avons déjà dit, est applicable aux protéides en présence d'une forte concentration saline. Puis, ils étudient la solubilité des protéides relativement peu solubles, comme l'hémoglobine ou la caséine, en l'absence de sels ou en présence de traces de sels seulement. La solubilité est, dans ce cas, en première approximation, proportionnelle à la racine carrée de la concentration. Finalement, ces auteurs (2) retrouvent la formule de solubilité d'un ion ou d'un

(1) COHN, *Jour. of Gen. Physiol.*, 4, 697 (1922) ; *Physiol. Reviews*, 5, 394 (1925) ; COHN et HENDRY, *Jour. of Gen. Phys.*, 5, 524 (1922-23) ; COHN et BERGGREN, *Jour. of Gen. phys.*, 7, 45 (1924-25) ; COHN et BERGGREN et HENDRY, 7, 81 (1924-25) ; COHN et PRENTISS, *Jour. of Gen. Phys.*, 8, 619 (1925-27) ; COHN, HENDRY et PRENTISS, *Jour. of Biol. Chem.*, 63, 721 (1925) ; COHN et GREEN, *Jour. of Biol. Chem.*, 78, XXXII (1928) ; COHN et GREEN, *Jour. of Biol. Chem.*, 92, XLIV (1931) ; COHN et GREEN, *Jour. of Biol. Chem.*, 100, XXVIII (1933).

(2) GREEN, *Jour. of Biol. Chem.*, 93, 495 (1931) ; 93, 517 (1931) ; 95, 48 (1932).

sel quelconque, formule qui résulte de la loi de DEBYE-HÜCKEL. D'après cette loi, la solubilité d'un sel est donnée par la formule :

$$\text{Log } S/S_o = \frac{0,5 V_1 V_2 \sqrt{\mu}}{1 + A \sqrt{\mu}} - K's\mu \quad (a)$$

et celle d'un ion :

$$\text{Log } S/S_o = \frac{0,5 V^2 \sqrt{\mu}}{1 + A \sqrt{\mu}} - K's\mu$$

formule dans laquelle :

S est la solubilité de la substance dans les conditions expérimentales,

S_o sa solubilité en l'absence d'électrolytes,

μ la force ionique (1),

$V_1 V_2$ le type de valence (2),

0,5 une constante théorique ayant cette valeur à 25°,

A une constante qui dépend du diamètre moyen effectif, b , de tous les ions en solution et d'une distance réciproque, k . La valeur de ce facteur A calculée par DEBYE est très faible.

Nous voyons immédiatement que, lorsque la variable μ tend vers zéro, c'est-à-dire lorsque la concentration tend vers zéro, le deuxième terme $Ks\mu$ tend à devenir constant (3), d'autre part, A étant très petit, $A\sqrt{\mu}$ devient négligeable pour des valeurs très faibles de μ , et nous pouvons écrire :

(1) La force ionique définie par LEWIS est égale à $\sum \frac{V^2 Ci}{2}$ où Ci = concentration ionique en *molalité* (ion gr. pour 1.000 gr. d'eau).

Mais, ici, il faudrait employer la force ionique définie par DEBYE dans laquelle la concentration est exprimée en molécules pour 1.000 cc. de solution.

(2) Pour la *solubilité* d'un sel peu soluble quelconque $V_1 V_2$ représentant la valence de l'anion et du cation du sel considéré. Dans le cas de la solubilité d'un ion, la première partie de la formule devient :

$$0,5 V^2 \sqrt{\mu}$$

V étant la valence de l'ion. Mais, pour les protéides, le facteur du terme en racine carrée est peu clair et il est préférable de l'appeler le « type de valence » comme le font COHN et GREEN.

(3) Lorsque la variable indépendante, μ , tend vers zéro, l'infiniment petit principal étant $\sqrt{\mu}$, μ , infiniment petit d'ordre supérieur, devient négligeable par rapport à $\sqrt{\mu}$.

$$\text{Log } S = 0,5 V_1 V_2 \sqrt{\mu} + Cte$$

tandis que, si la concentration augmente, μ augmente, et c'est le premier terme (1) qui tend à devenir constant. Nous retrouvons alors l'équation de SÖRENSEN :

$$\text{Log } S \pm A - B\mu$$

L'équation (a) permet, comme l'a fait GREEN (2) de calculer une valence apparente du protéide considéré, dans des conditions données.

De la formule logarithmique (a) COHN (2) tire une conclusion intéressante : il propose de l'utiliser comme test de pureté des protéides. Dans tous les cas où il y aurait proportionnalité entre la concentration saline et le logarithme de la solubilité avec une zone unique de précipitation, on pourrait en conclure que le protéide est pur.

A la suite de ces travaux, plusieurs auteurs ont appliqué la loi de solubilité précédente à diverses substances et ont pu en vérifier l'exactitude.

PALMER (4), par exemple, étudie en détails la solubilité de la lactoglobuline cristallisée et arrive aux conclusions suivantes :

a) En présence d'un excès de sulfate de soude, la substance se comporte comme une espèce chimique obéissant à la loi de DEBYE-HÜCKEL :

$$\log S = b - Ks\mu$$

où $b = 4,13$.

$Ks = 0,6$;

μ est la force ionique où la concentration est rapportée

(1) Ce terme peut s'écrire, en effet,

$$\frac{0,5 V_1 V_2}{\frac{1}{\sqrt{\mu}} + A}$$

il tend vers $\frac{0,5 V_1 V_2}{A}$ quand μ tend vers l'infini.

(2) GREEN, *Journ. of Biol. Chem.*, 95, 48 (1932).

(3) COHN, *Physiol. Reviews*, V, 349 (1925).

(4) PALMER, *Jour. of Biol. Chem.*, 104, 359 (1934).

à 1.000 gr. du solvant, c'est donc la force ionique définie par LEWIS.

b) En présence de faibles concentrations en $ClNa$:

- 1° la solubilité est indépendante de la phase saturante,
- 2° de la préparation.

$$\log S = 0,5 V_1 V_2 \sqrt{\mu} + \log S_0$$

$S_0 = 0,3$ pour 1.000 (par extrapolation).

KÜHN et DESNOUELLE vérifient de la même façon que la partie protéidique du *ferment jaune* est un protéide pur (1).

SLOTTA et FRAENKEL-CONRAT trouvent, toujours par la même technique, que le protéide qu'ils obtiennent sous forme cristalline à partir du venin de serpent est une espèce chimique (2).

Ainsi, la connaissance des lois physico-chimiques de la solubilité des protéides peut apporter une aide précieuse aux chimistes en leur donnant un critère de pureté de ces substances. Et ceci montre que l'étude chimique ne doit pas précéder nécessairement l'étude physico-chimique des corps, et que l'inverse, dans bien des cas, peut conduire à des résultats plus rapides et plus féconds.

Influence du pH sur la solubilité.

La plupart des auteurs qui ont étudié la solubilité des protéides se sont surtout préoccupés de l'influence de la concentration en sels ou en protéides. Ils ont plus ou moins négligé le rôle de la concentration en ions hydrogène ou ne l'ont envisagé que dans des conditions assez particulières. Pourtant, dès 1905, MELLANBY (4) (5) attirait l'attention sur le rôle de l'acidité du milieu sur la précipitation de l'euglobuline (5).

(1) KÜHN et DESNOUELLE, *Ber. d. d. dem. Gs.*, 70, 1907 (1937).

(2) SLOTTA et FRAENKEL-CONRAT, *Ber. d. d. dem. Gs.*, 71, 1076 (1938).

(3) MELLANBY, *The Jour. of Physiol.*, 33, 338 (1905).

(4) MELLANBY, *The Jour. of Physiol.*, 36, 288 (1907).

(5) MELLANBY ne parle que de « globuline » mais il la définit comme étant un protéide insoluble dans l'eau et soluble dans des solutions salines diluées. C'est en réalité la définition actuelle de l'euglobuline.

Il constatait, en effet, que des solutions d'euglobuline dans des solutions salines diluées précipitaient par addition de différents acides. Ce résultat était obtenu en opérant de la façon suivante : il ajoutait aux solutions protéidiques des sels neutres jusqu'à début de précipitation, puis il acidifiait à l'aide de quantités variables d'un acide fort dilué. L'influence précipitante de l'acide était déterminée en dosant le protéide resté en solution. Il concluait de ses expériences que la teneur en ions H^+ avait une influence sur la précipitation par les sels neutres surtout au voisinage du point isoélectrique.

Peu après, MICHAËLIS (1) (2) (3) et ses collaborateurs consacrent de nombreux travaux à une étude systématique de ce sujet ; mais il s'agissait pour eux de déterminer l'influence du pH sur la solubilité des protéides en l'absence de sels neutres ou en présence de très faibles concentrations salines.

Malheureusement, certains protéides, les albumines par exemple, sont très solubles dans ces conditions quel que soit le pH . Il était donc nécessaire de diminuer leur solubilité soit en ajoutant une quantité donnée d'alcool, soit en dénaturant au préalable le protéide par la chaleur. Indépendamment de la complication introduite de cette façon dans l'interprétation des faits expérimentaux, les résultats obtenus étaient assez contradictoires, même dans les cas où la solubilité était suffisamment faible dans certaines régions de l'échelle des pH pour qu'il soit inutile de dénaturer le protéide ou d'ajouter de l'alcool (hémoglobine, globuline). De leurs premiers travaux, MICHAËLIS et ses collaborateurs concluent que les protéides présentent un *minimum* de solubilité à leur point isoélectrique. Cette conclusion était basée, à vrai dire, sur des résultats obtenus à l'aide de méthodes expérimentales très critiquables — la solubilité, en particulier, était mesurée le plus souvent par de simples lectures d'opalescence ou de louche — et il serait préférable, en tout cas, de parler non pas d'une coïncidence entre le point iso-

(1, 2, 3) MICHAELIS et RONA, *Bioch. Zeitsch.* 27, 38 (1910) 1 ; 28, 193 (1910) 2.

électrique et le minimum de solubilité, mais plutôt de la superposition d'une zone isoélectrique avec une zone de minimum de solubilité. D'ailleurs, les auteurs eux-mêmes remarquent, par la suite, que cette coïncidence n'est pas tout à fait constante : la présence de quantités d'électrolytes relativement très faibles suffisant à déplacer sensiblement le minimum de solubilité vers la région acide. Ce fait est, au surplus, fort difficile à interpréter car nous savons aujourd'hui que les électrolytes déplacent également le point isoélectrique. Quoi qu'il en soit, dans une première approximation, on peut admettre, comme conclusion de ces travaux que, en l'absence de sels ou en présence de traces de sels, les protéides présentent un *minimum* de solubilité au *voisinage* de leur point isoélectrique. Cependant, hâtons-nous de dire que la détermination d'un minimum de solubilité reste une technique inadéquate de la mesure du point isoélectrique.

SÖRENSEN et JYRGENSEN (1), CHICK et MARTIN (2) (3) observent des faits analogues toujours avec des protéides dénaturés par la chaleur. Puis CHICK (4) montre que l'euglobuline présente elle aussi un minimum de solubilité à son point isoélectrique (5). Mais on peut formuler sur ces expériences les mêmes critiques que sur celles de MICHAËLIS.

Récemment, GREEN (6) reprend la question au cours d'un important travail sur la solubilité de l'hémoglobine et de la caséine. Ceci le conduit à élaborer une théorie de la solubilité de ces substances en fonction du *pH* et pour de faibles concentrations salines. Sa théorie est essentiellement basée sur des considérations de force ionique et d'activité d'après l'hypothèse de DEBYE et HÜCKEL. Les formules théoriques

(1) SÖRENSEN et JYRGENSEN, *Bioch. Zeitsch.*, 31, 397 (1911)

(2) CHICK et MARTIN, *The Jour. of Physiol.*, 45, 261 (1912).

(3) CHICK et MARTIN, *Bioch. Journ.*, 7, 380 (1913).

(4) CHICK, *Bioch. Journ.*, 7, 318 (1913).

(5) Cette analogie de comportement de l'albumine dénaturée par la chaleur et de la globuline n'est pas d'ailleurs une confirmation de l'opinion émise par STARK et par MOLL suivant laquelle l'albumine serait transformée en globuline par la chaleur car, dès cette époque (1904), ABDERHALDEN montrait la différence de composition de ces deux substances.

(6) GREEN, *Jour. of Biol. Chem.*, 93, 517 (1931).

ainsi obtenues donnent des valeurs numériques sensiblement comparables aux chiffres expérimentaux.

Le sujet dont nous nous occupons plus particulièrement, à savoir l'influence du pH sur la solubilité des protéides en présence de très fortes concentrations salines a été très peu étudié. Il n'y a guère que SÖRENSEN et GREEN qui se soient occupés de la question. Et encore ces auteurs n'ont étudié l'influence du pH que pour des variations restreintes de celui-ci. SÖRENSEN arrive à la conclusion que pour une concentration donnée en sulfate d'ammonium le logarithme de la solubilité est proportionnel au pH . Ainsi on obtient l'équation isotherme de solubilité complète de l'ovalbumine cristallisée :

$$\log S = -0,22 + 5,41 - 1,7 (pH - 4,90)$$

D'un point de vue théorique, elle est difficile à interpréter.

Quant à GREEN (1), il a étudié l'influence du pH sur la solubilité de la carboxyhémoglobine en présence de tampons de phosphates. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce sujet dans la discussion des résultats expérimentaux.

Citons enfin les travaux de M. MACHEBŒUF (2) sur l'albumine du sérum. Cet auteur envisage la question sous un angle pratique : la séparation des protéides du sérum par les sels neutres. Ceci le conduit à étudier l'influence du pH sur la précipitation en présence de fortes concentrations en sulfate d'ammonium, et il observe que l'on peut précipiter totalement les albumines du sérum pour une concentration en sulfate d'ammonium à peine supérieure à la demie saturation si l'on amène la réaction du milieu au pH de 3,8.

S'inspirant de cette observation, SANDOR et BONNEFOI (3), puis SANDOR, BONNEFOI et J.-J. PÉREZ (4) étudient l'influence du pH sur la précipitation des protéides sériques en présence de teneurs en sels très élevées. Ils notent deux accidents dans

(1) *Loc. cit.*, p. 19.

(2) MACHEBŒUF, Thèse de sciences, Paris, 1928.

(3) SANDOR et BONNEFOI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*

(4) SANDOR, BONNEFOI et PÉREZ, *C. R. Ac. Sciences*, 197, 1254 (1934).

la courbe de solubilité des albumines et un seul dans celle des globulines. Ces résultats ne constituaient qu'une première approximation car ces auteurs avaient négligé certains facteurs qui, au premier abord, leur avaient paru négligeables et ne l'étaient pas en réalité. C'est le cas, notamment, des ions sulfates apportés dans les solutions par l'acide sulfurique ajouté pour augmenter la concentration en ions hydrogène et qui modifiaient, en même temps, la teneur en ions sulfates et la force ionique.

*
* *

Ce bref résumé historique montre que de nombreux auteurs ont compris l'intérêt théorique et pratique que présente l'étude de la solubilité des protéides ; mais, dans la recherche d'une formule de solubilité, s'ils ont envisagé l'influence de certains facteurs physiques avec le plus grand soin, ils n'ont pas cherché à approfondir le rôle du *pH*, sauf pour de faibles concentrations salines ou dans des conditions un peu particulières. Les seuls auteurs qui aient vraiment abordé la question sont SÖRENSEN et GREEN, mais ils n'ont étudié l'influence du *pH* en présence de fortes concentrations salines que pour de faibles variations de celui-ci.

Cependant, il nous est apparu qu'une théorie complète de la solubilité des protéides ne saurait être élaborée sans que soit résolu ce problème. Avant donc d'entreprendre la discussion des travaux précédents, nous avons cru devoir chercher à le résoudre : c'est ce qui fera l'objet des pages suivantes.



Travaux personnels.

(Influence du pH sur la solubilité des protéides sériques
en présence de concentrations salines élevées).

Techniques générales.

Les déterminations de solubilité de ce travail ont porté exclusivement sur les protéides du sérum de cheval. Ces protéides présentent l'avantage de pouvoir être obtenus facilement en quantités importantes, leur concentration dans le sérum étant relativement élevée. D'autre part, à l'état naturel, ils existent sous forme de solution ; après leur isolement, ils sont encore très solubles et conviennent donc parfaitement à des études de solubilité.

Les meilleures méthodes d'isolement des protéides du sérum reposent sur leur insolubilisation par les sels neutres. Vers le milieu du siècle dernier, PANUM, VIRCHOW et CLAUDE BERNARD avaient déjà utilisé cette propriété (1) ; mais c'est seulement après les travaux de HOFMEISTER, en 1887-1888, que la méthode devint classique. Elle est employée encore aujourd'hui presque sans modifications.

Il est à remarquer que les protéides isolés par cette méthode sont définis seulement par leur préparation et nous ignorons si nous nous trouvons en présence d'espèces chimiques ou de mélanges. Dans ce cas, la composition de ces mélanges peut varier avec les conditions d'isolement.

Pour que les produits isolés soient comparables à eux-mêmes, il est donc indispensable que les conditions de leur préparation soient rigoureusement fixées.

(1) Voir p. 7.

Préparation du matériel.

La technique adoptée pour la séparation des protéides du sérum s'appuie sur leur différence de solubilité en présence du sulfate d'ammonium : les globulines sont insolubles dans les solutions à demi-saturées en sulfate d'ammonium ; les albumines sont insolubles seulement quand la concentration atteint la saturation. On peut d'ailleurs, comme l'a montré M. MACHEBŒUF (1), précipiter totalement les albumines pour une concentration en sulfate d'ammonium à peine supérieure à la demi-saturation si on amène le *pH* de la solution à 3,8. On peut, enfin, séparer les globulines en deux fractions : les euglobulines insolubles dans l'eau pure et les pseudoglobulines solubles dans l'eau pure.

A. — Globulines.

A un volume déterminé de sérum de cheval, on ajoute un volume égal d'une solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium (2). Les globulines précipitent. On laisse reposer une demi-heure puis on centrifuge énergiquement. Les cauxmères sont recueillies : elles seront utilisées ultérieurement pour la préparation des albumines. Le précipité de globulines est dissous dans une quantité d'eau distillée égale aux deux tiers du volume du sérum utilisé. Pour purifier les globulines, on les précipite une seconde fois de cette solution en ajoutant une quantité de la solution saturée de sulfate d'ammonium égale au volume d'eau distillée qui a été utilisé pour les dissoudre. Le précipité formé est recueilli comme précédemment, dissous dans l'eau et précipité une troisième fois.

Après ces trois précipitations successives, les globulines sont dissoutes dans l'eau distillée.

(1) MACHEBŒUF, Thèse de sciences, Paris, 1928.

(2) Le sulfate d'ammonium utilisé a toujours été purifié par deux cristallisations successives. Avant la première cristallisation, la solution bouillante était additionnée d'ammoniaque et filtrée pour éliminer les traces de fer que le sel aurait pu contenir.

B. — *Pseudoglobulines.*

En dialysant les globulines contre de l'eau distillée, les euglobulines, insolubles dans l'eau pure, précipitent tandis que les pseudoglobulines restent en solution. Il suffit d'éliminer les euglobulines par centrifugation pour avoir une solution de pseudoglobulines. Il est inutile d'insister sur cette opération qui se confond avec celle de la purification par dialyse traitée plus loin en détails.

C. — *Albumines* (1).

Les eaux-mères des globulines sont additionnées d'une solution saturée de sulfate d'ammonium jusqu'à obtention d'un louche persistant. On ajoute alors de l'acide sulfurique cinquième normal jusqu'à virage au rouge net du papier au rouge de méthyle. On laisse reposer une demi-heure, on recueille par centrifugation les albumines précipitées et on les dissout dans l'eau légèrement alcalinisée par de l'ammoniaque.

D. — *Albumines cristallisées* (2).

La méthode repose sur le fait que des solutions d'albumines sériques demi-saturées en sulfate d'ammonium et amenées au *pH* de 4,8 laissent cristalliser les albumines pourvu que certaines conditions physiques soient réalisées. Les eaux-mères des globulines peuvent être utilisées comme précédemment pour cette préparation.

Avec une partie aliquote de ces eaux-mères, on établit d'abord une courbe de titrage potentiométrique. Cette courbe donne la quantité d'acide qu'il faut ajouter à un volume déterminé des eaux-mères pour les amener au *pH* désiré. On ajoute alors au reste des eaux-mères la quantité d'acide sul-

(1) Méthode de M. MACHERGUEF.

(2) Technique déjà utilisée et décrite par G. SANDOR, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1^o, 877 (1936).

Cette méthode résulte d'ailleurs des travaux de HOFMEISTER, *Zeitschr. Physiol. Chim.*, XIV, 165 (1890), puis HOPKINS et PINKUS, *Jour. Physiol.*, XXIII, 130 (1891-99) et enfin : SÖRENSEN et HÖYRUP, *C. R. lab. Carlsberg*, XII, 164 (1915-17).

furique normal nécessaire pour les amener au *pH* de 5,1-5,2, puis on ajuste à 4,8 avec de l'acide *N/5*. La solution est abandonnée ensuite 24 heures à la glacière, puis 48 heures à la température du laboratoire. Pour purifier les cristaux ainsi obtenus, on centrifuge la solution à faible vitesse et les cristaux déposés au fond des tubes sont lavés deux fois avec une solution demi-saturée en sulfate d'ammonium et de *pH* 4,8.

Après ces lavages qui ont éliminé une partie des éléments amorphes de faible densité, les cristaux provenant d'un litre de sérum sont dissous dans 30 à 40 cm³ d'eau légèrement alcalinisée par de l'ammoniaque en quantité juste suffisante pour obtenir une dissolution complète des cristaux. On centrifuge énergiquement pour éliminer les parties amorphes insolubles et on filtre le liquide décanté. Dans ce liquide, on fait cristalliser l'albumine une seconde fois au *pH* de 4,8 en présence de sulfate d'ammonium à 1/2 saturation.

Les cristaux obtenus sont lavés puis on les fait cristalliser une troisième fois. On dissout enfin l'albumine dans la plus petite quantité d'eau possible en ajoutant, si nécessaire, quelques gouttes d'ammoniaque normal.

DIALYSE.

Les solutions protéidiques préparées comme il vient d'être dit sont très riches en sulfate d'ammonium et doivent être purifiées par dialyse. La dialyse est, en outre, une étape fondamentale pour la détermination du point isoionique. S'il ne s'agissait que d'une purification, on pourrait se contenter d'une dialyse assez sommaire ; mais la mesure du point isoionique exige une dialyse prolongée qui rend l'opération plus délicate, vu les risques d'infection et de dénaturation qu'elle entraîne. Le dialyseur utilisé est simple. Il consiste essentiellement en un sac de collodion fixé sur un support cylindrique en verre. Chaque sac est préparé à partir d'une solution à 5 % de collodion dans un mélange à parties égales d'éther et d'alcool. On plonge un moule en verre dans cette solution, on le retire lentement et on laisse sécher deux minutes à l'air libre la pellicule déposée en faisant tourner

sans cesse le moule suivant son axe placé horizontalement. Ainsi, la pellicule déposée a une épaisseur uniforme. On recouvre cette couche de collodion d'une seconde couche qu'on laisse sécher cinq minutes ; enfin, on coagule le collodion par immersion dans l'eau. Après dix minutes, on peut détacher le sac de son moule (1).

Le support est formé de deux pièces de verre s'emboitant l'une dans l'autre par un rodage. La pièce supérieure est recourbée en S et s'élargit en boule dans la partie médiane de l'S. Ce dispositif permet d'établir une pression d'une dizaine de centimètres de mercure à l'intérieur du dialyseur.

Le sac de collodion est fixé sur la partie inférieure du support par simple adhérence obtenue par la dessiccation à l'air de la partie du collodion montée sur le moule. Pour que l'adhérence soit parfaite, le diamètre du support et celui du sac doivent être à peu près les mêmes et, surtout, il faut que le support soit très propre et humecté d'alcool. La partie du collodion qui est introduite sur le support doit être ramollie avec de l'alcool. Quand le sac est monté sur le support, on essuie l'excès d'alcool et on verse du collodion frais qu'on étale en couche mince ; puis, on verse une nouvelle quantité de collodion qui s'étale en couche épaisse formant bourrelet. On laisse enfin sécher vingt-quatre heures la partie du sac montée sur le support, le reste étant immergé dans l'eau pour éviter la dessiccation.

La dialyse a toujours été effectuée à la glacière, sous toluène (2). La vitesse d'élimination des éléments diffusibles paraît n'être conditionnée que par la perméabilité des sacs. L'équilibre entre le liquide dialysé et le dialysat s'établit rapidement, même si on néglige d'agiter les liquides.

En général, on dialyse pendant quatre ou cinq jours contre une solution à 5 pour 1.000 de sulfate de sodium, sous une pression de 8 à 10 cm. de mercure pour remplacer le cation ammonium par le cation sodium, puis pendant dix à quinze

(1) Le moule est constitué par un gros tube à essai percé à son extrémité. Avant de confectionner le sac de collodion, on bouche ce trou avec une goutte de collodion qu'on laisse sécher dix minutes.

(2) La présence du toluène est indispensable pour éviter l'infection. SÖRENSEN, *C. R. Lab. Carlsberg*, 1915-17, vol. 12.

jours contre de l'eau distillée, sous pression plus réduite. Le dialysat est changé tous les jours et la pression mercurielle rétablie aussi souvent qu'il est nécessaire. On peut suivre l'élimination du sulfate d'ammonium en recherchant l'ammoniaque dans le dialysat par le réactif de Nessler. Ce réactif, quoique très sensible, ne permet plus d'en déceler dès le sixième jour de dialyse.

Pour préparer une solution de pseudoglobulines, après avoir dialysé contre du sulfate de sodium pendant quelques jours, puis quatre ou cinq jours contre de l'eau distillée, on retire le liquide du dialyseur et on le centrifuge pour éliminer les euglobulines qui ont précipité parce que insolubles dans l'eau pure. La solution limpide obtenue est remise à dialyser dans un sac de collodion neuf, contre de l'eau distillée, pendant une dizaine de jours. Si, à ce moment, la solution est redevenue trouble on la centrifuge avant de la recueillir (1).

Pour obtenir des globulines totales, on ne peut évidemment pas dialyser contre de l'eau distillée puisque une fraction des globulines est insoluble dans l'eau pure. On dialyse alors contre de l'eau très légèrement alcalinisée par de la soude (jusqu'à virage au vert pâle du papier au bleu de bromothymol).

Dans tous les cas, après la dialyse, les solutions sont centrifugées énergiquement pour éliminer les protéides dénaturés qui se sont formés avec le temps et au contact du toluène, puis, filtrées sur filtres mouillés pour éliminer le toluène. Les solutions enfin obtenues sont conservées dans

(1) SÖRENSEN acidifiait la solution après la dialyse pour éliminer totalement les euglobulines par précipitation. Cette acidification est inutile dans notre cas, par suite de la durée prolongée de la dialyse. En effet, lorsque la fraction colloïdale du liquide à dialyser a des propriétés électrolytiques, la dialyse procéde toujours en deux temps. Dans le premier temps, relativement court, s'éliminent les ions diffusibles « libres » et, dans le second, sensiblement plus long, les ions diffusibles « liés » traversent le sac du dialyseur. Puisque le point isoionique et le pH de la solution protéidique pur sont pratiquement identiques (voir plus loin p. 34) la solution protéidique sera à son point isoionique lorsque la dialyse sera complètement terminée. Le minimum de solubilité coïncide avec le point isoionique en l'absence de sel donc, finalement, la solution complètement dialysée aura le pH du minimum de solubilité du protéide considéré et, comme nous l'avons dit, une acidification est inutile.

des fioles en quartz, à la glacière en présence de petits cristaux de thymol pour éviter l'infection.

La concentration en protéides de ces solutions est déterminée soit en coagulant par l'alcool bouillant le protéide et en pesant le coagulum sur filtre d'Iéna après l'avoir lavé à l'alcool, à l'éther, à l'alcool, à l'eau et séché à 110° jusqu'à poids constant ; soit en évaporant à sec un volume connu et en pesant le résidu après un séjour de vingt-quatre heures dans une étuve à 120°.

La première méthode n'est assez exacte qu'en présence d'un excès de sel ; nous ne l'avons donc utilisée que dans le cas particulier où les solutions étaient déjà riches en sel. (Voir plus loin, p. 30.)

Dosage d'azote.

Au cours des expériences de solubilité proprement dites, la détermination précise des concentrations en protéides des solutions a toujours été faite en dosant leur teneur en azote par la micro-méthode de KJELDAHL avec l'appareil de Parnas et Wagner.

Cette méthode est trop connue pour qu'il soit nécessaire de la décrire. Elle n'est point parfaite puisqu'elle ne permet pas de doser l'azote de certains noyaux cycliques et de corps à azotes soudés (hydrazine). G. BERTRAND (1) a d'ailleurs publié récemment une mise au point sur son application aux travaux de recherches en chimie biologique. Cet auteur estime la méthode de DUMAS, surtout comme on la pratique actuellement, beaucoup plus précise et beaucoup plus sûre ; mais, aussi, infiniment plus longue et plus délicate. Lorsqu'il s'agit de dosages en série, la méthode de KJELDAHL offre l'avantage d'être beaucoup plus rapide et elle peut être presque aussi exacte si l'on détermine, une fois pour toutes, l'erreur qu'elle comporte avec la substance étudiée en pratiquant un dosage par la méthode de DUMAS. Quand il s'agit

(1) G. BERTRAND, *C. R. Lab. Carlsberg* (série chimique), 22, p. 67 (1938) et *Ann. des Fermentations*, t. 4, n° 3, p. 182 (1938).

de dosages comparatifs, ce qui est notre cas, il n'est même pas nécessaire de faire ce dosage témoin car une erreur systématique importe peu. La méthode de KJELDAHL devient alors la méthode de choix.

Un point délicat de la méthode de KJELDAHL est la destruction de la substance organique. Pour cette destruction, de nombreux auteurs ont cherché à améliorer le rendement de la technique initiale proposée par KJELDAHL soit en ajoutant des catalyseurs (WILFARTH, dès 1885), soit en élevant la température d'ébullition du mélange par addition d'anhydride phosphorique ou de sulfate de potassium (GUNNING) (1). SÖRENSEN utilise cette technique depuis longtemps déjà pour le dosage de l'azote des protéides. BOIVIN (2), il y a quelques années, a étudié la question en détails et il conclut que la technique proposée par PREGL (3) convient parfaitement pour la minéralisation des albumines.

Personnellement, nous avons, après quelques tâtonnements, adopté la technique suivante qui est celle de PREGL presque sans modifications :

Dans un ballon Kjeldahl en pyrex, on introduit successivement :

- 1 cm³ de la solution protéidique (4).
- 2 cm³ d'acide sulfurique concentré.
- 1 goutte d'une solution à 10 % de sulfate cuivrique.
- 0,5 gr. de sulfate de potassium.
- une petite cloche de verre pour favoriser l'ébullition.

On chauffe ce mélange non seulement jusqu'à décoloration complète, mais encore pendant une demi-heure après la décoloration. G. BERTRAND insiste en effet sur ce point car il estime, avec raison, que la transformation en sulfate d'am-

(1) GUNNING, *Zeitschr. and Ch.*, 28, 188, 1889.

(2) BOIVIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 11, 1929, p. 1344.

(3) PREGL, « La microanalyse organique quantitative ». Trad. d'après la 2^e édition allemande. Les Presses universitaires, Paris, 1923.

(4) Quantité variable suivant la concentration en protéides de la solution. D'une façon générale, pour nos dosages d'azote, il était commode d'avoir une teneur en azote comprise entre 0 mgr. 7 et 5 mgr., ce qui correspond environ à une quantité de protéides comprise entre 2 mgr. 8 et 32 mgr. Ces quantités correspondent à des volumes d'acide sulfurique N/20 (pour le titrage final) compris entre 1 cc. et 7 cc.

monium n'est pas toujours complète après la décoloration.

L'expérience nous a montré qu'une demi-heure était suffisante dans notre cas.

La concentration en azote étant connue, si on veut exprimer la concentration en protéides, il suffit de multiplier la concentration en azote par un facteur approprié. Dans le cas des albumines, ce facteur est 6,25. Pour les globulines totales, euglobulines, pseudoglobulines, il est voisin de ce chiffre, mais ne paraît pas absolument constant.

Voici d'ailleurs quelques chiffres que nous avons obtenus en dosant dans des solutions protéidiques, d'une part l'azote trichloracétique par la méthode de KJELDAHL ; d'autre part, en pesant sur filtre d'Iéna le protéide coagulé par l'alcool bouillant, lavé à l'éther chaud puis à l'alcool et à l'eau et en établissant le rapport : $\frac{\text{Protéide coagulé}}{\text{azote trichlorac.}}$

Globulines en présence de SO^4Am^2 1/2 saturation	Protéide coagulé en gr. p. 1000	N trichloracétique en gr. p. 1000	Rapport
1	44,725	7,13	6,24
2	44,32	7,17	6,18
3	44,12	7,26	6,07
Euglobulines (SO^4Am^2 1/4 de saturation)			
1	31,725	5,01	6,33
2	31,2	5,07	6,14
3	31,27	5,19	6,02
Pseudoglobulines (SO^4Am^2 entre le 1/4 et 1/2 saturation)			
1	13	2,12	6,18
2	13,12	2,107	6,22
3	12,75	2,07	6,15

Dans ces expériences, sont appelées « euglobulines » la fraction précipitée du sérum par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et, « pseudoglobulines », la fraction précipitée à demi-saturation après élimination des euglobulines.

Cette méthode ne peut être utilisée qu'en présence d'une forte concentration saline car, sans cela, les protéides coagulent incomplètement par l'alcool chaud. Par contre, nous

ignorons si l'acide trichloracétique précipite totalement les protéides en présence de fortes concentrations salines. Ainsi, les chiffres trouvés sont entachés d'erreur et ne constituent qu'une approximation.

Nous avons aussi établi le rapport $\frac{\text{Protéides}}{\text{Azote}}$ avec des solutions protéïdiques purifiées par dialyse en dosant l'azote soluble de ces solutions par micro-Kjeldahl et en pesant le poids de substance sèche et les cendres. En retranchant le poids des cendres du poids de la substance sèche, on a très exactement le poids de protéides. Les pseudoglobulines dont il s'agit ici sont constituées par la fraction soluble dans l'eau distillée des protéides précipitées du sérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Voici quelques-uns des chiffres obtenus :

SÉRUM I.

Pseudoglobulines.....	10,38	%
Cendres.....	0 gr. 14	%
Azote dosé.....	1 gr. 6186	%
Pseudoglobulines = 10,38 — 0,014 = 10,366		
$\frac{\text{Pseudoglobulines}}{\text{Azote}} = \frac{10,366}{1,6186} = 6,4$		

SÉRUM II.

Pseudoglobulines.....	6,26	%
Cendres.....	0,09	%
Azote dosé.....	0,9632	%
Pseudoglobulines = 6,26 — 0,09 = 6,17 %.		
$\frac{\text{Pseudoglobulines}}{\text{Azote}} = \frac{6,17}{0,9632} = 6,4$		

SÉRUM III.

Pseudoglobulines.....	6,12	%
Cendres.....	0,11	%
Azote dosé.....	0,92	%
Pseudoglobulines = 6,12 — 0,11 = 6,01		
$\frac{\text{Pseudoglobulines}}{\text{Azote}} = \frac{6,01}{0,92} = 6,53$		

Ce chiffre est plus élevé que les précédents et plus élevé que le chiffre donné par la plupart des auteurs. Mais la mé-

thode comporte une cause d'erreur : les pseudoglobulines entraînent des lipides du sérum, la pesée des pseudoglobulines comporte donc une erreur en plus qui augmente la valeur du rapport $\frac{\text{Pseudoglob.}}{\text{Azote}}$. Le poids des lipides entraînés peut être très variable car la teneur en lipides du sérum est elle-même variable, ce fait suffirait à expliquer les différences observées.

En somme, les rapports $\frac{\text{Protéides}}{\text{Azote}}$ peuvent être considérés pratiquement comme constants et dans la relation des résultats expérimentaux nous avons toujours exprimé les concentrations en protéides par les teneurs en azote directement mesurées.

Mesure des pH et courbes de titrage.

Toutes les mesures de *pH* ont été faites potentiométriquement par la méthode classique d'opposition avec une électrode à hydrogène et un demi-élément au calomel. Cette méthode est trop connue pour qu'il soit nécessaire de la décrire.

L'établissement des courbes de titrage, c'est-à-dire la détermination des *pH* que prend une solution suivant les plus ou moins grandes quantités d'acide ou de soude titrés qu'on lui ajoute, a été fait par deux méthodes un peu différentes suivant la précision que l'on désirait obtenir. Quand on ne recherchait pas une très grande précision, on ajoutait, à une partie aliquote de la solution étudiée, des quantités croissantes d'acide ou de soude et on mesurait le *pH* de la solution après chaque addition de liqueur titrée. Pour ce faire, la solution était placée dans un petit vase de 20 cm³ muni d'un bouchon percé de trois ouvertures. Par l'une des ouvertures, passait l'électrode à hydrogène ; par la seconde, un tube de conduction en verre rempli d'une solution saturée de chlorure de potassium solidifiée par de la gélose et, par la troisième, on pouvait introduire la pointe d'une microburette pour verser l'acide ou la soude. Ce dispositif permettait,

après chaque addition de liqueur titrée, de bien mélanger par agitation la solution protéidique et cette liqueur titrée. Cette méthode a l'avantage d'être rapide ; mais elle manque de précision. Ses principales causes d'erreur sont d'abord la dilution de la solution protéidique qui résulte des additions successives de liqueur titrée (1) et, surtout, la formation de mousse. Cette mousse, d'autant plus stable que la solution est plus visqueuse, rend difficile le mélange de la liqueur titrée et de la solution dont on mesure le pH . Enfin, elle peut conduire à des pertes de la solution. Nous n'avons employé cette méthode que pour obtenir rapidement un ordre de grandeur.

Pour avoir des résultats précis, chaque point était déterminé séparément sur un mélange particulier, ce qui rendait sans importance la formation de mousse. Les différents mélanges étaient réalisés de telle sorte que les concentrations en ions H^+ ou OH^- étaient les seules variables. Il est facile de réaliser de tels mélanges. On prendra, par exemple, 2 cm^3 de la solution protéidique, puis on lui ajoutera des quantités de solution titrée et d'eau distillée de façon à réaliser un volume final de 5 cm^3 . C'est-à-dire que, si l'on ajoute 1 cm^3 d'acide, on ajoutera 2 cm^3 d'eau distillée ; si on ajoute $1,5\text{ cm}^3$ d'acide, on ajoutera $1,5\text{ cm}^3$ d'eau et ainsi de suite. Nous avons eu parfois à dresser des courbes de titrage en présence de sels et nous verrons plus loin qu'il est encore possible de réaliser dans ce cas des mélanges où seule la teneur en ions hydrogène ou oxyhydrile est variable.

Les mesures de pH correspondant aux différentes teneurs en acide et en soude étant faites, on dresse une courbe en portant les quantités d'acide et de base en ordonnée et les pH correspondants en abscisse. Cette courbe permet de savoir avec précision quelle quantité d'acide ou d'alcali il faut ajouter à un volume connu de la solution protéidique pour obtenir un pH déterminé.

(1) Le pH peut être fonction de la concentration en protéide.

Point isoïonique.

Quelques considérations théoriques sont ici indispensables pour faire comprendre la méthode de mesure du point isoïonique que nous avons eu contamment à utiliser au cours de ce travail.

Le point isoïonique d'un ampholyte est un point critique dans l'échelle des pH pour lequel cet ampholyte n'émet et n'absorbe pas d'ions hydrogène (1). Le pH d'une solution aqueuse d'un protéide rigoureusement pur devrait, pratiquement, coïncider avec son point isoïonique (2).

La détermination du point isoïonique d'un protéide serait donc très simple s'il était possible d'obtenir ce protéide à l'état pur. Mais ce n'est pas le cas. Les protéides retiennent avec une grande énergie de nombreuses impuretés et, en particulier, des acides ou des alcalis suivant qu'ils se trouvent au-dessus ou au-dessous de leur point isoïonique.

La présence de ces impuretés ioniques entraîne un déplacement de la valeur du pH qu'aurait la solution protéidique si elle était pure. Pour mesurer le point isoïonique, il faut donc mesurer la quantité d'acide ou d'alcali fixée par le protéide, calculer le changement de pH que peut introduire cette quantité d'acide ou d'alcali dans un volume donné de la solution protéidique et retrancher ou ajouter cette valeur à celle du pH mesuré. Plus simplement, la quantité d'acide ou d'alcali retenus par un volume déterminé de la solution protéidique étant connue, on ajoute à un même volume de la solution la quantité d'alcali ou d'acide juste nécessaire pour neutraliser l'acide ou l'alcali retenus par le protéide. Le pH de la solution est alors le point isoïonique du protéide.

Pratiquement, il est plus facile de doser un alcali retenu par

(1) SÖRENSEN, *C. R. Lab. Carlsberg*, XIX, 41, 1927.

(2) En effet, la différence entre le point isoionique et le pH de la solution protéidique pure est égale au changement de pH que peut provoquer dans le volume d'eau qui dissout le protéide, la quantité d'acide ou de base nécessaires pour amener cette eau au pH du point isoionique du protéide. Or, pour une concentration suffisante du protéide, cette quantité est infime et, pratiquement, le point isoionique et le pH de la solution protéidique pure coïncident. G. SANDOR, *Bull. Soc. Ch. Biol.*, XVIII, 877, 1936.

le protéide qu'un acide retenu par ce même protéide parce que le cation de l'alcali se retrouve dans les cendres après incinération tandis que la plupart des anions sont complètement détruits ou éliminés (1). Les protéides sont donc transformés en protéïdates de sodium purs. La détermination du point isoionique comporte finalement les opérations suivantes :

- 1° Remplacement des cations par le cation sodium seul ;
- 2° Elimination des anions ;
- 3° Dosage de la soude retenue par le protéide, neutralisation de cette soude et mesure du *pH* après la neutralisation.

Les opérations (1) et (2) se font, nous l'avons vu, en dialysant la solution protéïdique d'abord contre une solution à 1 % de sulfate de sodium, puis contre de l'eau distillée. On s'assure de l'élimination complète de l'anion sulfate en ajoutant une goutte d'une solution de chlorure de baryum à 10 % à une petite partie de la solution protéïdique.

Le dosage du sodium est fait par pesée après calcination et transformation en sulfate de sodium. Pour cela, un volume connu de la solution protéïdique est évaporé à sec dans une capsule de platine tarée et le résidu est calciné dans un four à moufle. Si les cendres obtenues ne sont pas parfaitement blanches, on ajoute quelques gouttes d'acide nitrique, on évapore et calcine une seconde fois. On verse ensuite sur les cendres deux à trois gouttes d'acide sulfurique pur, évapore au bain d'air et calcine quelques instants sur un bec Bunsen. Enfin, pour transformer le sulfate acide de sodium qui a pu se former, en sulfate neutre, on ajoute du bicarbonate d'ammonium, évapore, calcine et pèse le sulfate de sodium neutre contenu dans la capsule. Connaissant la quantité de sodium et, par suite, celle de soude contenue dans un volume donné

(1) G. S. ADAIR et M. E. ADAIR, *The Bioch. Journ.*, 28, 1934, p. 1230. Ces auteurs, qui déterminent le point isoionique par des mesures de potentiel de membrane, dosent le CO^2 fixé par le protéide au lieu de doser le *Na* comme nous le faisons ici. Ils éliminaient au préalable les bases combinées au protéide par dialyse contre de l'eau distillée puis contre de l'eau contenant du CO^2 . Cependant, cette technique n'est applicable qu'au cas particulier de l'hémoglobine.

de la solution, il suffira donc de prélever une portion aliquote de cette solution, de lui ajouter une quantité d'acide sulfurique équivalente à la quantité de soude qu'elle contient et de mesurer le *pH*. Le *pH* mesuré est, nous l'avons vu, la valeur du point isoïonique du protéide.

La quantité de sodium retenue par le protéide étant relativement faible, il faut incinérer des quantités assez importantes de protéides pour avoir un poids de cendres suffisant. C'est-à-dire qu'il faut utiliser des solutions dont la concentration en protéides soit au moins égale à 2 % et en prélever 10 cm³. Il est d'ailleurs facile d'obtenir des solutions de cette concentration en dialysant sous pression. Nous avons même pu, par ce procédé, atteindre des concentrations de 15 %.

Note sur le point isoïonique.

Au début de ces études de solubilité, nous avons cherché à mesurer le point isoïonique par une méthode un peu différente dérivée de la méthode originale de MICHAËLIS. Dire qu'une substance est capable d'émettre ou d'absorber des ions H⁺, c'est dire que cette substance est un tampon. L'effet tampon dépend lui-même de la quantité d'ions H⁺ que la substance peut émettre ou fixer dans des conditions données. Par suite, le point isoïonique sera la valeur du *pH* pour laquelle l'effet tampon d'un ampholyte passe par zéro, ou, si l'on préfère, change de signe. Si donc, avec les mêmes axes de coordonnées, on trace la courbe de titrage de l'eau distillée et celle d'une solution aqueuse pure d'un protéide, le point d'intersection de ces deux courbes se fait pour une valeur des ordonnées égale au *pH* du point isoïonique puisque c'est à l'intersection de ces deux courbes que l'effet tampon passe par zéro (1). Cette méthode présente d'ailleurs la même cause d'erreur que la précédente : les impuretés retenues par les protéides déplacent les courbes de titrage et les intersections ne correspondent pas au point isoïonique. SÖRENSEN éliminait cette cause d'erreur en dosant exacte-

(1) L'effet tampon a, en gros, pour valeur la différence des ordonnées de la courbe de titrage du protéide et de celle de l'eau distillée pour une même valeur de l'abscisse.

ment les différents ions diffusibles contenus dans les solutions protéidiques.

Cette méthode est d'une application délicate. SANDOR (1), pour la simplifier, transformait le protéide en protéidate de sodium, dosait le sodium et calculait la valeur du déplacement de la courbe parallèlement à l'axe des abscisses produit par la présence du sodium. La courbe ainsi déplacée coupait celle de l'eau distillée au point isoionique. La seule différence avec la technique de SÖRENSEN était, en somme, qu'il suffisait de doser un seul ion, le sodium.

Etude de la solubilité.

On trouvera dans ce chapitre la description de la technique générale qui a été employée ; mais, dans le compte rendu des expériences, nous aurons à signaler de nombreuses modifications à cette technique ; modifications imposées par la diversité du matériel étudié.

La solubilité d'une substance dépend d'un certain nombre de facteurs. Pour déterminer l'influence de l'un d'eux sur la solubilité, il faut maintenir tous ces facteurs constants sauf celui dont on veut étudier l'influence. Pratiquement, il s'agit de réaliser une série de mélanges placés dans les mêmes conditions et ne différant les uns des autres que par la valeur du facteur à étudier. La réalisation de ces conditions n'est d'ailleurs pas toujours rigoureusement possible.

Les principaux facteurs qui interviennent dans la solubilité aqueuse des protéides en présence des sels neutres sont :

- la température,
- la concentration en sels,
- la concentration en protéides,
- la concentration en ions hydrogène,
- le temps.

La technique primitivement utilisée — portant exclusivement sur les globulines — était relativement simple. La

(1) *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, XVIII, 877 (1936).

solution de globulines, obtenue comme il a été indiqué (page 23), n'était pas dialysée, elle renfermait donc une quantité importante de sulfate d'ammonium, quantité mesurée directement par pesée de l'anion SO_4^{4-} à l'état de sulfate de baryum. On mesurait d'abord les variations du pH de ces solutions en fonction de volumes variables d'acide sulfurique $N/5$ ajouté à une portion aliquote (1). Puis à des portions aliquotes de la solution, on ajoutait des volumes variables d'acide sulfurique $N/5$ contenant du sulfate d'ammonium au quart de saturation (2) et toutes les prises étaient complétées au même volume par une solution de sulfate d'ammonium au quart de saturation. Les précipités formés étaient recueillis par centrifugation au bout de dix minutes et leur azote protéidique dosé. Pour ce faire, on les dissolvait dans l'eau distillée, puis on les précipitait cinq fois de suite par l'acide trichloracétique pour éliminer le sulfate d'ammonium, l'azote était enfin dosé par la micro-méthode de KJELDAHL (3).

Cette technique, quoique donnant déjà des résultats intéressants, prêtait à de nombreuses critiques. En particulier, la présence du sulfate d'ammonium ne permettait pas de remonter suffisamment haut dans l'échelle des pH parce que l' NH_3 de ce sel est déplacé et se dégage à l'état gazeux quand la réaction du milieu devient alcaline. Ce fait entraîne une modification continuelle du pH au cours de la mesure et une variation de la concentration en sulfate d'ammonium dans les mélanges où l'on étudie la solubilité. Or, la concentration en ce sel doit être la même dans les différents mélanges et le pH de chacun d'eux doit être rigoureusement fixe.

Nous avons alors remplacé le sulfate d'ammonium par le sulfate de sodium qui n'est tampon dans aucune région de l'échelle des pH et possède une base fixe.

La technique était presque identique à la précédente en ce

(1) La solution de globulines utilisée pour ce titrage avait la même concentration en protéides et sulfate d'ammonium que dans celle utilisée pour l'étude de la solubilité. L'acide sulfurique $N/5$ contenait du sulfate d'ammonium à la même concentration.

(2) La solution de globulines contenait en effet ce sel à cette concentration.

(3) SANDOR, BONNEFOI, PÉREZ, *C. R. Ac. Sc.*, 1254 (1933).

qui concerne la réalisation des mélanges et les dosages d'azote précipité par l'acide trichloracétique.

La principale modification portait sur l'isolement des protéides du sérum qui étaient précipités par le sulfate de sodium suivant une technique proposée par HOWE (1). Les résultats obtenus étaient comparables aux précédents et donnaient la solubilité des globulines en présence du sulfate de sodium pour des valeurs du pH allant de 3,5 à 8,5.

Dans toutes ces expériences, on ne mesurait pas, à vrai dire, la solubilité, mais en réalité la précipitation. La solubilité était calculée en retranchant la quantité de globulines précipitées de la quantité de globulines avant la précipitation. Cette façon de procéder était peu précise : on ne dosait pas seulement les globulines précipitées, mais encore celles de la solution restée adhérente au tube de centrifugeuse et surtout celles de la solution retenue dans le précipité. L'inconvénient ne serait pas grave si la quantité retenue était toujours la même ou si elle était proportionnelle au volume du précipité, mais elle dépend encore de la structure physique du précipité et de la viscosité de la solution. Or, la structure du précipité et la viscosité varient avec la réaction du milieu.

Enfin, l'évaluation des pH des différents échantillons par comparaison avec la courbe de titrage était défectueuse. D'abord, parce que la quantité d'acide ou d'alcali ajoutée à l'un des échantillons pouvait ne pas être rigoureusement la même que celle de la courbe de titrage (2), et ensuite parce que la précipitation peut modifier la concentration en ions H^+ .

Pour éviter ces causes d'erreurs, il fallait donc mesurer directement la concentration en protéides et la concentration en ions hydrogène de chaque échantillon après la précipitation. La solution étant saturée en protéides (puisque en présence de son précipité), on mesurait ainsi exactement la solubilité des protéides pour un pH déterminé.

(1) HOWE, *The Jour. of Biol. Chem.*, 49, p. 93 (1921).

(2) Cette cause d'erreur est importante quand le protéide se trouve au voisinage de son point isoélectrique. Il n'est pas tampon dans cette région et de faibles quantités d'acide font varier énormément son pH .

Après ces modifications, les courbes de solubilité obtenues, sans contredire les premières observations, étaient beaucoup plus régulières.

Il restait encore cependant une grave cause d'erreur. Nous l'avions envisagée dès le début de ces recherches ; mais elle nous avait paru négligeable et nous n'avions pas cru devoir en tenir compte. Cette cause d'erreur est la suivante : pour augmenter la concentration en ions H^+ , on ajoute de l'acide sulfurique. Or l'addition de cet acide n'apporte pas seulement des ions H^+ ; mais encore des ions SO^4-- . A première vue, la variation de la teneur en ions SO^4-- ayant cette origine nous avait semblé pouvoir être négligée par rapport à l'énorme quantité apportée par le sulfate de sodium. En fait, il n'en était rien et quelques irrégularités des courbes de solubilité disparurent quand nous fîmes les précipitations avec une concentration en ions SO^4-- rigoureusement constante. Ceci s'explique probablement par le fait que les ions SO^4-- apportés par l'acide sulfurique n'agissent pas simplement par action de masse — ce qui serait sans doute négligeable — mais encore en modifiant la force ionique des solutions, et la force ionique a , dans certains cas, une influence énorme sur la solubilité.

La technique utilisée était finalement la suivante :

Avec une portion aliquote de la solution protéidique, on étudie les variations du pH en fonction des quantités d'acide sulfurique titré ou de soude titrée ajoutées à cette solution. La courbe de titrage ainsi obtenue permet de savoir approximativement les quantités d'acide ou de soude qu'il faut ajouter aux différentes prises d'essai pour obtenir les pH désirés. On préparait alors une série de mélanges de même volume établis de la façon suivante :

SO^4Na^2 sec.	a gr.
SO^4H^2 N/20.	x cm ³
SO^4Na^2 N/20 (en SO^4)	$(3 - x)$
Solution protéidique.	2 cm ³
Total	5 cm ³

et

SO^4Na^2 sec.	a gr.
$OHNa$ N/20 contenant SO^4Na^2 N/20	y cm ³
SO^4Na^2 N/20	(3 — y)
Solution protéidique.....	2 cm ³
Total	5 cm ³

Ces chiffres ne sont évidemment donnés qu'à titre d'exemple : les proportions d'acide, de base, de solution protéidique, etc..., de même que le volume final des mélanges pouvaient être très variables.

Quoi qu'il en soit, ces mélanges ont la même force ionique, la même concentration en protéides, en sels, en ions sulfate. Toutefois, la concentration en cations sodium n'est pas rigoureusement constante ; mais, pour les mélanges de la première série — qui constitueront d'ailleurs la majorité des points de la courbe de solubilité — la variation de la concentration en cations Na^+ est compensée par une variation inverse et exactement équivalente en cations H^+ . Et ainsi, la concentration totale en ions et la *force ionique* ne varient pas. Dans les mélanges de la seconde série — qui ne constitueront généralement qu'un point extrême de la courbe — la variation de la teneur en cations Na^+ , apportés par la soude, n'est pas compensée par celle des cations H^+ , ce qui entraînera une variation — d'ailleurs infime — de la force ionique d'un point de la courbe de solubilité. Cette variation est impossible à éviter si l'on veut maintenir la concentration en anions sulfate rigoureusement constante. Enfin, le *pH variait dans de larges limites*.

Pour réaliser ces mélanges, on dissolvait d'abord le sulfate de Na placé dans un tube de centrifugeuse à l'aide de la solution N/20 de sulfate de Na et de l'acide titré (ou de la soude) ; les tubes étaient ensuite maintenus dans un bain-marie à 33° pour rendre la dissolution plus rapide. La dissolution achevée, les tubes bien bouchés étaient abandonnés au moins douze heures au laboratoire pour que l'équilibre de température soit parfaitement atteint. On ajoutait alors la solution protéidique, également à la température du laboratoire, en agitant continuellement pour que le mélange ne cesse, dans la mesure du possible, d'être homogène. Tous les mélanges étaient abandonnés un même temps, puis centri-

fugés dix minutes et décantés aussitôt après la centrifugation. On mesurait immédiatement la concentration en ions hydrogène des liquides décantés et leur teneur en azote par les méthodes que nous avons indiquées plus haut.

La description d'une expérience fera mieux comprendre la marche suivie.

Protocole d'une expérience.

La solution de protéides préparée et dialysée comme nous l'avons vu (p. 23) est centrifugée énergiquement au moment de l'emploi pour éliminer toute trace de protéides dénaturés. Puis, on la recueille dans une fiole de quartz stérilisée (1).

1° Titrage potentiométrique de la solution.

A un centimètre cube de cette solution, on ajoute 2 cm³ d'eau distillée, puis de l'acide sulfurique N/40 par fractions de 0,20 cm³. On note après chaque addition d'acide le voltage de la solution. On répète la même opération avec de la soude N/40 et on dresse une courbe en portant les volumes d'acide ou de soude en abscisses et les voltages en ordonnées. On obtient la courbe de la figure 1.

2° Concentration en protéides de la solution.

On évapore 4 cm³ de la solution dans une capsule de platine, au bain-marie, puis on porte à l'étuve à 110° jusqu'à poids constant et on pèse.

Poids de substance sèche 0,4155. La concentration en protéides de la solution est donc :

$$\frac{0,4155 \times 100}{4} = 10,38 \text{ p. } 100.$$

(1) Les vases de silice sont indispensables lorsqu'il s'agit de protéides complètement dialysés. En effet, les cations contenus dans les récipients de verre se dissolvent dans la solution protéidique et en modifient continuellement le *pH*.

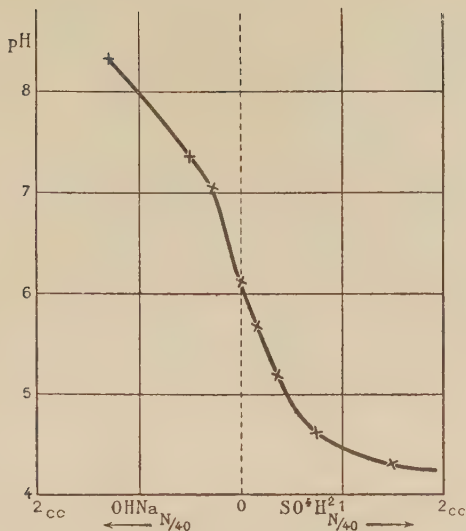


FIG. 1. — Courbe de titrage d'un protéide (pseudoglobulines).

3° Détermination du point isoionique.

La substance sèche contenue dans la capsule de platine est calcinée au four à moufle. Si cette calcination ne permet pas d'obtenir des cendres blanches, on ajoute quelques gouttes d'acide nitrique et on calcine une seconde fois. Aux cendres blanches obtenues, on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique pur, on évapore au bain d'air et on calcine quelques instants au rouge sombre. On répète une fois cette opération. On ajoute enfin un peu d'eau et quelques cristaux de bicarbonate d'ammonium, on évapore au bain-marie (1), on calcine avec précaution et on pèse le sulfate de sodium neutre contenu dans la capsule :

Poids de SO^4Na^2 1 mgr. 8

Une solution vingtième normale de sulfate de sodium renferme 3,55 gr. de ce sel au litre ; soit donc 3,55 mgr. dans 1 cm³.

(1) Une dessiccation complète est indispensable pour éviter les déflagrations pendant la calcination. Il est donc préférable, après évaporation au bain-marie, de porter 12 h. à l'étuve à 110° avant de calciner.

1,8 mgr. de sulfate de sodium correspondent par suite à :

$\frac{1 \times 1,8}{3,55} = 0,507 \text{ cm}^3$ de solution $N/20$ de sulfate de sodium
ou de soude.

On prend 4 cm^3 de la solution protéidique, on lui ajoute $0,507 \text{ cm}^3$ de $SO^4H^2 N/20$ et on mesure le pH .

pH trouvé..... 5,7

Cette valeur est, nous l'avons vu, le point isoionique de la solution protéidique (cf. p. 34).

4° Etude de la solubilité.

On se propose d'étudier la solubilité du protéide (il s'agit de pseudoglobulines dans le cas présent) à huit pH différents compris entre 8,5 et 4,5 environ, la concentration en sulfate de sodium étant égale à 12 p. 100 et la teneur en protéides voisine de 4 p. 100.

Dans huit tubes de centrifugeuse, préalablement équilibrés pour pouvoir être centrifugés 4 par 4, on pèse 0,6 gr. de sulfate de sodium sec, puis on ajoute dans chacun d'eux des quantités variables d'acide sulfurique vingtième normal (ou de soude) et de sulfate de sodium en solution aqueuse de même titre. Les quantités d'acide, de soude et de sulfate de sodium ajoutées sont choisies de telle sorte que leur somme occupe un volume de 3 cm^3 , c'est-à-dire que si dans un tube on met une quantité (x) d'acide sulfurique $N/20$, il faudra ajouter $(3 - x)$ de la solution $N/20$ de sulfate de sodium ; si on met (y) cm^3 de soude $N/20$ contenant du sulfate de sodium au même titre, il faudra ajouter $(3 - y) \text{ cm}^3$ de sulfate de sodium $N/20$.

Les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie à 33° jusqu'à dissolution complète du sulfate de sodium, on agite et on abandonne les tubes bien bouchés à la température du laboratoire. Après douze heures, on ajoute dans chaque tube 2 cm^3 de la solution protéidique à l'aide d'une micro-burette, goutte à goutte, en agitant constamment. Après dix minutes, au cours desquelles les tubes ont été agités plusieurs fois, on

centrifuge dix minutes et les liqueurs sont séparées des précipités par décantation. On prélève immédiatement 1 cm³ de chaque liqueur que l'on met dans des petits ballons de KJELDAHL. On ajoute ensuite à chaque ballon 2 cm³ d'acide sulfurique pur, 1 goutte d'une solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100, du sulfate de potassium et une petite cloche de verre pour favoriser l'ébullition ; enfin on continue la destruction et le dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL, comme nous l'avons indiqué précédemment. D'autre part, on mesure le *pH* de chaque liqueur. On trouve, dans le cas présent, les valeurs suivantes :

<i>pH</i>	8,54	7,38	6,84	6,14	5,74	5,23	4,66	4,33
<i>N</i> sol. p. 1000 ...	4,76	4,93	5,25	5,34	5,52	5,42	4,91	3,30

En général, les *pH* de chaque mélange mesurés directement sont très voisins de ceux indiqués par la courbe de titrage faite au début de l'expérience. Toutefois, dans certaines expériences, nous avons observé que le sulfate de sodium faisait remonter sensiblement les *pH* de nos mélanges. Ce fait a été également noté par Palmer (1). Il paraît être dû à des impuretés de ce sel, car sa constitution chimique ne permet pas d'expliquer son influence sur le *pH* des solutions protéidiques et, d'autre part, certains échantillons du commerce étaient sans action. Les *pH* des différents mélanges étant mesurés directement, l'importance d'une modification de ceux-ci par addition de sulfate de sodium était d'ailleurs assez secondaire. Par précaution, nous avons cependant préféré n'utiliser que du sulfate de sodium que nous avons purifié par cristallisation fractionnée, puis desséché au four à moufle. Ce sel purifié était sans influence sur le *pH* des solutions protéidiques.

(1) PALMER, *Jour. of Biol. Chem.*, 104, 359 (1934).



Résultats expérimentaux.

Etude des globulines.

C'est avec les globulines totales — fraction protéidique précipitée du sérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation — que nous avons entrepris l'étude de la solubilité des protéides sériques et c'est exclusivement sur cette fraction qu'ont porté nos premières recherches et que la technique finalement adoptée a été mise au point. Nous avons indiqué, dans le chapitre précédent, la technique primitivement utilisée, les causes d'erreur qu'elle comportait et les modifications successives que nous avons dû y apporter pour supprimer ces causes d'erreurs dans la mesure du possible et aboutir à une technique sinon parfaite, du moins suffisamment précise pour permettre d'entreprendre une explication théorique des phénomènes observés.

Nous ne reviendrons pas sur ces modifications et sur les raisons qui nous ont conduit à les adopter ; mais il n'est peut-être pas inutile de rapporter brièvement les résultats obtenus dans les premières expériences. Ils permettront de se rendre compte que, si les faits observés sont devenus beaucoup plus nets et les résultats plus exacts à mesure que s'améliorait la technique, il n'y a cependant jamais eu de contradiction entre ces faits.

Voici quelques-uns des résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

I. — *Précipitation des globulines en présence de sulfate d'ammonium.*

Dans ces expériences, on dosait l'azote trichloracétique des globulines précipitées et non celui des globulines restées

en solution. Les *pH* des différents mélanges n'étaient pas mesurés directement, mais donnés par une courbe de titrage faite avec une portion aliquote de la solution protéidique (voir p. 37).

SÉRUM I.

Concentration en sulfate d'ammonium.... 1/4 de saturation
 Concentration en globulines..... 3,21 %
 Durée de la précipitation..... 10 minutes

<i>pH</i>	8,12	7,38	6,55	6,04	4,66	4,35	3,64
Azote précipité % de solution en mgr.	54	42,5	33,5	33,5	47	63,3	19,7

SÉRUM II.

Concentration en sulfate d'ammonium.... 1/4 de saturation
 Concentration en globulines..... 3,32 %
 Durée de la précipitation..... 10 minutes

<i>pH</i>	7,54	6,78	6,16	5,23	3,28	2,91
Azote précipité % en mgr.	50	45	30	50	112	284

SÉRUM III.

Concentration en globulines totales 1,87 %
 Durée de la précipitation..... 10 minutes

1° Concentration en sulfate d'ammonium : 1/5 de saturation.

<i>pH</i>	7,68	6,02	4,58	2,6
Azote précipité % en mgr.	11,5	9,5	16,2	64,2

2° Concentration en sulfate d'ammonium : 1/4 de saturation.

<i>pH</i>	7,48	6,24	3,94	2,6
Azote précipité % en mgr.	32	20,5	76,8	18,3

Dans ces expériences on observe donc très nettement un minimum de précipitation — et, par suite, un maximum de solubilité — aux environs de *pH* 6.

II. — Solubilité des globulines en présence de sulfate de sodium.

Dans ces expériences l'azote protéidique resté en solution est dosé directement. Les *pH* sont encore donnés par comparaison avec la courbe de titrage (voir p. 39).

SÉRUM IV.

Concentration en sulfate de sodium.....	11,8 %						
Concentration en globulines.....	3,7						
Durée de la précipitation.....	10 minutes						
<i>pH</i>	7,70	7,05	6,72	5,70	5,35	5,00	4,70
Azote soluble %							
en mgr.	368,2	369,6	411,6	459	439	404	365

SÉRUM V.

Concentration en sulfate de sodium.....	11,8 %						
Concentration en globulines.....	4,3						
Durée de la précipitation.....	10 minutes						
<i>pH</i>	6,6	6,3	6,16	5,80	5,70	5,56	4,72
Azote soluble %							
en mgr.	529	567	567	592	602	551	492

SÉRUM VI.

Dans cette expérience et la suivante, les *pH* des différentes prises d'essai sont mesurés directement (v. page 66).

Concentration en sulfate de sodium	11,75 %						
Concentration en globuline	1,365 %						
Durée de la précipitation.....	10 minutes						
<i>pH</i>	6,65	6,5	5,76	5,68	5,52	4,84	
Azote soluble %	187,6	188	193	182	181,3	173	

SÉRUM VII.

Concentration en sulfate de sodium	11,75 %						
Concentration en globulines.....	1,719 %						
Durée de la précipitation.....	10 minutes						
<i>pH</i>	6,94	6,54	6,14	6,08	5,9	5,7	4,84
Azote soluble %	149,8	205,8	207,2	227,5	208	204	193

Dans les expériences précédentes, on voit donc que les globulines présentent toujours un maximum de solubilité pour une valeur du *pH* comprise entre 5,6 et 6. Les points isoioniques de ces mêmes globulines n'ont pas été mesurés car, à cette époque, nous ne disposions pas d'une méthode pratique de détermination du point isoionique des protéides. Mais, par la suite, G. SANDOR (1) et moi-même avons effectué

(1) *Loc. cit.*, p. 34.

de nombreuses mesures du point isoïonique des globulines et nous avons toujours trouvé que la valeur du *pH* de ce point était comprise entre 5,8 et 6. *On peut donc conclure de ces premières expériences que la solubilité des globulines, en présence de fortes concentrations salines, paraît passer par un maximum au point isoïonique.*

Nous avons montré (p. 40) qu'il existait une grave cause d'erreur dans ces expériences : la teneur en ions SO^4 — n'était pas absolument constante parce que, pour faire baisser le *pH*, nous ajoutions de l'acide sulfurique. Les expériences suivantes ont été réalisées (voir p. 40) en maintenant la concentration en ions SO^4 — rigoureusement constante et nous avons mesuré le point isoionique des globulines utilisées. Les détails de la technique utilisée dans les expériences suivantes ont été donnés au chapitre « Protocole d'une expérience ».

Voici quelques résultats :

SÉRUM VII bis (Figure 2).

Concentration en sulfate de sodium.....	12 %							
Concentration en protéides du mélange initial..	4,26 %							
Durée de la précipitation.....	10 minutes							
<i>Point isoïonique pH = 6,00</i>								
<i>pH</i>	8,05	7,36	6,96	6,76	6,32	5,95	5,5	4,88
<i>N</i> soluble								
% en mgr.	354,2	370,3	397,6	431,2	470,4	508,2	477,4	306,6

SÉRUM VIII (Figure 3).

Concentration en sulfate de sodium	12 %							
Concentration en protéïdes du mélange initial..	3,7 %							
Durée de la précipitation.....	1/2 heure							
<i>Point isoïonique pH = 5,6</i>								
<i>pH</i>	8,65	8,5	6,9	5,6	5,26	5,02	4,66	4,34
<i>N</i> soluble								
% en mgr.	267,4	277,2	341,6	399	392	362,6	284	175

Dans ces deux expériences, la solubilité des globulines varie très régulièrement en fonction du *pH*. Elle passe par un maximum qui coïncide exactement avec le point isoïonique de ces globulines. Il n'y a aucune contradiction entre ces expériences et les précédentes. Et nous pouvons en con-

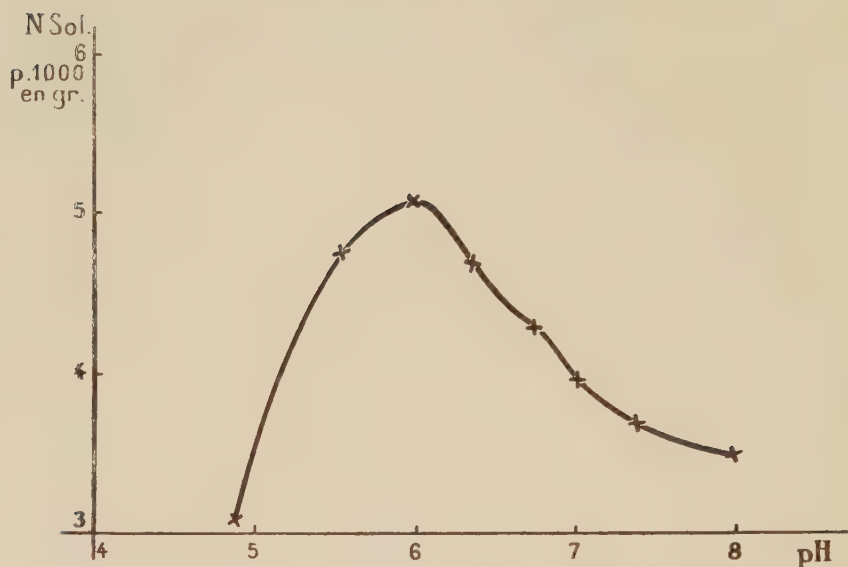


FIG. 2. — Solubilité des globulines en fonction du pH (sérum VII bis)
 $pH_i = 6,00$.

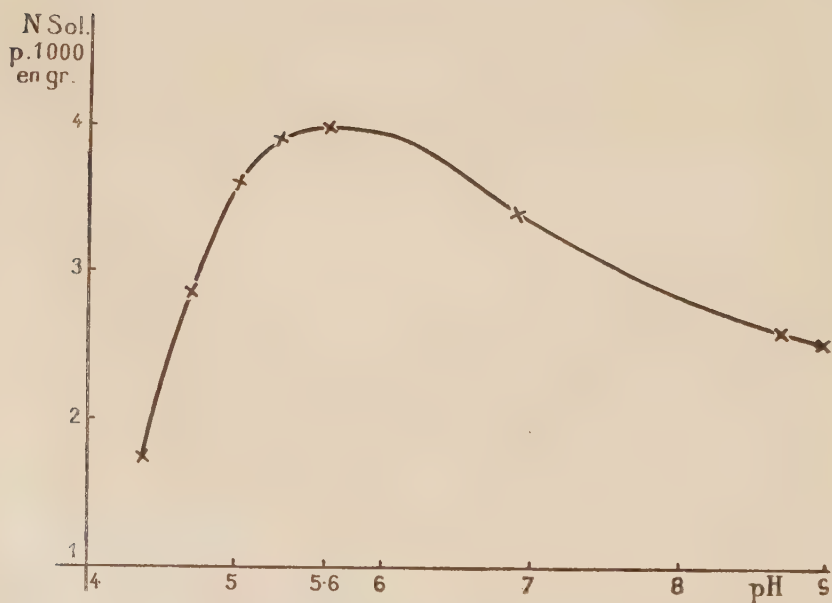


FIG. 3. — Solubilité des globulines en fonction du pH (sérum VIII)
 $pH_i = 5,6$.

clure que les globulines isoïniques ont une solubilité maximum.

NOTE SUR LES GLOBULINES.

Au cours de ces expériences, nous avons constaté une anomalie. Des globulines ont présenté un maximum de solubilité à *pH* 5,96 alors que la valeur de leur point isoïnique était 6,7. Il ne s'agissait pas d'erreurs de mesure car nous avons répété trois fois la même expérience avec les mêmes globulines et obtenu exactement les mêmes résultats. Il ne s'agissait pas non plus d'une infection microbienne car des tubes de bouillon et de gélose ensemencés avec cette solution globulinique sont restés stériles.

Ce qui nous paraît le plus probable, c'est que la dialyse prolongée en présence de soude (1) avait conduit à une hydrolyse partielle des globulines et que la mesure du point isoïnique des globulines devenait ainsi illusoire. De très nombreuses mesures du point isoïnique des globulines n'ont, en effet, jamais donné une valeur aussi élevée du point isoïnique.

Étude des albumines.

Pour l'étude de la solubilité des albumines, la technique précédente doit être très sensiblement modifiée. Cette modification est imposée par l'impossibilité pratique d'étudier la solubilité en présence de sulfate de sodium. En effet, les euglobulines et pseudoglobulines commencent à précipiter pour des concentrations en sulfate de sodium relativement faibles (2) et il est donc facile dans ce cas de réaliser des mélanges parfaitement homogènes en dissolvant d'abord le sel dans l'eau et l'acide (ou la base), puis en ajoutant dans ces mélanges la solution protéidique (v. p. 41 et 44). Avec les

(1) Rappelons que les globulines insolubles dans l'eau pure sont dialysées contre une solution légèrement alcaline.

(2) HOWE, *The Jour. of Biol. Chem.*, 49, p. 93 (1921). La précipitation des globulines serait totale pour une teneur en sulfate de sodium anhydre de 21 à 22 %, elle commencerait à 12 ou 13 %.

albumines, il faudrait réaliser des concentrations en sulfate de sodium beaucoup plus élevées et, pour y parvenir, le sel devrait être dissous dans la solution protéidique elle-même. Cette façon de faire serait très imprécise : le sulfate de sodium, à la température du laboratoire, se dissout très lentement et le temps de cette dissolution dépend de conditions qu'il serait impossible de rendre identiques pour les différents échantillons. Par suite, le temps de la dissolution du sel ne serait pas le même pour tous ces échantillons et ils ne seraient donc plus comparables les uns avec les autres puisque les protéides ne seraient pas restés en contact de la solution saline à la même concentration, pendant le même temps dans chacun d'eux. Enfin, au lieu de partir de mélanges homogènes, on partirait de systèmes diphasés et les protéides pourraient être modifiés d'une façon plus ou moins réversible au contact du sulfate de sodium solide. En résumé, l'obligation d'ajouter le sulfate de sodium directement aux solutions d'albumines empêche de réaliser des mélanges absolument comparables. L'expérience a d'ailleurs confirmé cette opinion *a priori* et, après quelques essais, nous avons dû renoncer à étudier la solubilité des albumines en présence du sulfate de sodium.

L'étude des albumines a donc été faite en présence du sulfate d'ammonium et la présence de ce sel nous a obligé à étudier non pas la solubilité proprement dite, mais la précipitation. Pour doser les protéides en solution, il aurait fallu, en effet, les séparer d'abord du sulfate d'ammonium en les précipitant plusieurs fois de suite par l'acide trichloracétique, or nous ignorons si l'acide trichloracétique précipite intégralement les protéides en présence de très fortes concentrations salines. Nous avons donc, comme au début de nos recherches sur les globulines, dosé l'azote protéidique des précipités en dissolvant ceux-ci dans l'eau puis en précipitant plusieurs fois de suite par l'acide trichloracétique avant de minéraliser par la méthode de KJELDAHL.

Nous avons signalé, à propos des globulines, que le sulfate d'ammonium présentait surtout l'inconvénient d'empêcher l'étude de la solubilité aux *pH* élevés. Cet inconvénient est sans grande importance dans le cas des albumines car leur point isoïonique étant sensiblement plus bas que celui des

globulines, il est sans grand intérêt d'étudier la solubilité aux pH élevés.

Les premières expériences sur les albumines ont été faites avec des albumines amorphes préparées par la méthode de M. MACHEBŒUF (1), dialysées pendant quatre jours contre du sulfate de sodium à 5 p. 1.000, puis dix jours contre de l'eau distillée, suivant la technique habituelle.

Pour obtenir une concentration constante en anions sulfate, les mélanges étaient réalisés de la façon suivante :

Acide sulfurique $N/10$	$x \text{ cm}^3$
Sulfate d'ammonium $N/10$	$0,3 - x$
Sulfate d'ammonium saturé et acide (1)	2,7
Solution d'albumine.....	2 cm^3
Volume total.....	5 cm^3

Voici les résultats de deux expériences :

SÉRUM I.

Concentration en albumine du mélange initial.	2,254 %
Concentration en sulfate d'ammonium.....	54 % de sat.
Concentration en azote du mélange initial....	0,36 %

Point isoionique = 5,12.

Durée de la précipitation 10 minutes.

pH	5,9	5,7	5,6	5,54	5,50	5,0
$N \text{ sol } \%$ en mgr.	287	286	282	267	231	144

SÉRUM II (Figure 4).

Concentration en albumines du mélange initial.	1,34 %
Concentration en sulfate d'ammonium.....	62 % de sat.

Point isoionique 5,2.

pH	7,18	6,48	5,74	5,3	4,9	4,62	4,24	3,36
$N \%$ précip..	14,84	13	15,12	26,32	120,4	165	168	171,5

Dans ces expériences, on observe en somme une diminution constante de la solubilité pour des pH décroissants compris entre 5,9 et 5 pour la première expérience et entre 7,18 et 3,36 pour la seconde. Le point isoionique n'est marqué par

(1) M. MACHEBŒUF, thèse de sciences, Paris, 1928.

(2) Le sulfate d'ammonium saturé et acide aux environs de pH 5 à 6 offre l'avantage de n'être pas tampon. On obtient cette solution en acidifiant la solution saturée neutre de sulfate d'ammonium jusqu'au virage à l'orangé du papier au rouge de méthyle.

aucun accident sur les courbes de solubilité. Il est à remarquer que la concentration en albumines était très faible ; mais il nous a été impossible, avec nos dialyseurs, de réaliser de plus fortes concentrations, les membranes de collodion se colmatant très rapidement.

L'étude des albumines nous a paru devoir être beaucoup plus instructive en utilisant les albumines cristallisées. L'état

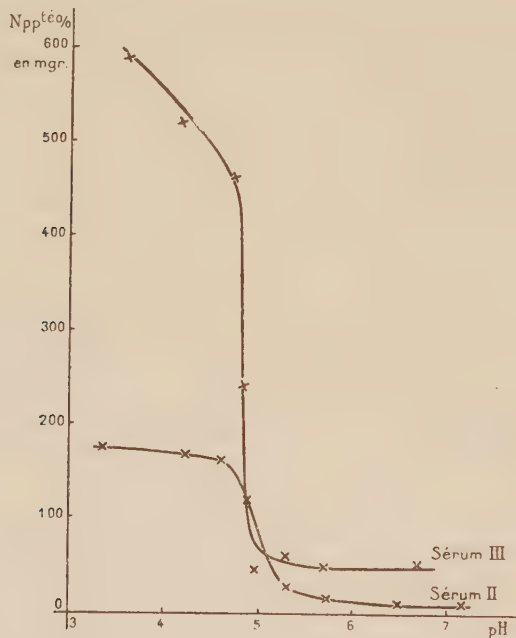


FIG. 4. — Précipitation des albumines en fonction au pH.

Sérum II. Albumines amorphes (solution peu concentrée en albumines). Sérum III. Albumines cristallisées (durée de précipitation trop courte)

cristallin n'est sans doute pas un critère de pureté absolu mais, d'une façon générale, un corps à l'état cristallin est beaucoup plus pur que le même corps à l'état amorphe et, en tout cas, deux échantillons cristallins d'origine différente sont plus comparables à eux-mêmes. Enfin, avec les albumines cristallisées on obtenait beaucoup plus facilement, par dialyse sous pression, des solutions concentrées.

Voici le résultat d'une expérience réalisée avec des albumines cristallisées préparées et purifiées comme nous l'avons

déjà vu au chapitre des techniques générales. La solution des protéides était d'abord additionnée de 10 p. 100 de sulfate d'ammonium et, avec cette nouvelle solution parfaitement limpide, on réalisait une série de mélanges de la façon suivante :

Acide sulfurique $N/2$	$x \text{ cm}^3$
Solution de sulfate d'Am. saturé non tampon...	2,5
Sulfate d'ammonium $N/2$	$(0,5-x)$
Solution d'albumines.....	2 cm^3
Volume total.....	$\frac{5 \text{ cm}^3}{}$

et

Soude $N/2$ (et $N/2$ en SO^4Am^2)	$x \text{ cm}^3$
Sulfate d'Am. saturée non tampon.....	$2,5 \text{ cm}^3$
Sulfate d'Am. $N/2$	$(0,5-x)$
Solution d'albumines.....	2 cm^3
Volume total.....	$\frac{5 \text{ cm}^3}{}$

Après dix minutes de contact, on centrifugeait dix minutes. Les précipités étaient dissous dans l'eau et reprécipités par de l'acide trichloracétique à 4 p. 100. On répétait cinq fois cette opération pour débarrasser complètement les précipités protéidiques du sulfate d'ammonium. Les dosages d'azote étaient continués comme dans les autres expériences :

SÉRUM III.

Concentration en azote.....	0,642 %							
Concentration en albumine du mélange initial.	4,04 %							
Concentration en sulfate d'ammonium.....	39 %							
Durée de la précipitation.....	10 minutes							
Point isoionique.....	5,12							
pH	6,7	5,84	5,32	4,96	4,82	4,54	4,16	3,6
Azote précipité								
% d'azote sol...	55,3	49,7	63	44,8	242	464,8	518	588

Les quatre premiers points forment très sensiblement un plateau, surtout si l'on tient compte que les erreurs de mesure, pour les dosages d'azote, ont été multipliées par dix (1). On n'observe, ici encore, aucun accident au point isoionique.

(1) Parce que les dosages n'étaient faits que sur le dixième des précipités. Par contre, pour le sérum II, les dosages étaient effectués sur la totalité des précipités.

Cette courbe n'est pas en contradiction avec les précédentes ; les variations de la solubilité avec le *pH* sont beaucoup plus accusées, mais le fait est dû, vraisemblablement, à la plus grande concentration en albumines. C'est un fait que nous avons déjà remarqué avec les globulines : *la concentration en protéides doit être suffisamment élevée pour que les différences de solubilité soient nettement perceptibles.*

Cette expérience comportait une grave cause d'erreur : la formation des précipités dans les différents mélanges se faisait de façon très inégale. Pour les *pH* compris entre 6,7 et 4,96, il ne s'agissait pas d'une précipitation, mais d'une cristallisation. Cette cristallisation débutait après un retard variable suivant les mélanges. Pour certains, la solution restait d'abord parfaitement limpide, puis brusquement cristallisait. Mais cette cristallisation n'était peut-être pas complètement achevée au moment de la centrifugation. Aux *pH* compris entre 4,96 et 3,6, il s'agissait vraiment d'une précipitation. En somme, les différents mélanges n'étaient pas comparables parce que le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre n'était pas le même pour chacun d'eux : un précipité amorphe et un précipité cristallin d'une substance ne se forment pas de façon identique. Enfin, en dosant l'azote des précipités, on dosait également l'azote d'une partie de la solution retenue par ces précipités. L'erreur ainsi commise sur les dosages d'azote était loin d'être systématique, car la structure d'un précipité cristallin est très différente de celle d'un précipité amorphe et, par suite, les volumes de solution retenue pouvaient être très variables.

Pour éviter l'erreur pouvant provenir d'une durée de précipitation trop courte pour que l'équilibre soit atteint dans les différents mélanges et pour vérifier, en même temps, l'influence de cette durée de précipitation, nous avons repris les expériences sur les albumines cristallisées en faisant varier la durée de précipitation dans de larges limites.

Voici les résultats obtenus avec une même solution d'albumines cristallisées (figure 5) :

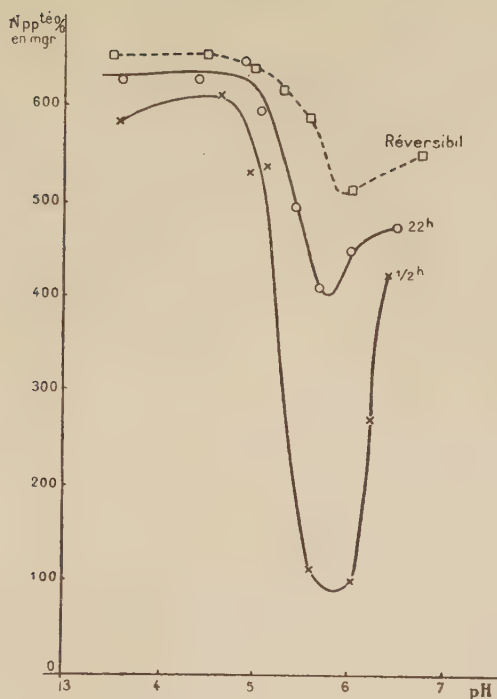


FIG. 5. — Précipitation des albumines (sérum)
(Influence de la durée et réversibilité du phénomène).

Concentration en albumine du mélange initial.. 4,136 %
Concentration en azote..... 0,67 %
Concentration en sulfate d'ammonium..... 6/10 de satur.
Point isoionique 5,02.

Durée de la précipitation : 1/2 heure.

<i>pH</i>	6,4	6,2	6,04	5,58	5,14	4,9	4,6	3,56
Azote préci- pité %....	422,1	271,6	98,7	112	540	530	614,6	585

Durée de la précipitation : 22 heures.

<i>pH</i>	6,5	6,00	5,7	5,44	5,04	4,9	4,4	3,6
Azote pré- pité %...	474,6	448	411,6	498,4	597,1	652	630	630

Ces deux courbes sont tout à fait comparables : elles présentent toutes les deux un minimum de précipitation pour une valeur du pH comprise entre 5,7 et 6. La durée de la précipitation ne déplace pas ce minimum, il en atténue seulement l'importance.

Nous avons voulu vérifier, enfin, si le phénomène était réversible et, pour cela, nous avons utilisé la même solution d'albumine en l'amenant d'abord au *pH* de son point iso-ionique par addition d'acide sulfurique. Nous sommes donc partis d'une solution d'albumines au *pH* de 5,02 tandis que dans les deux expériences précédentes le *pH* initial des solutions était 5,5. Toutes les conditions de la précipitation étaient par ailleurs les mêmes.

Durée de la précipitation : 23 heures.

<i>pH</i>	6,76	6,08	5,6	5,28	5,16	4,94	4,48	3,46
Azote								
préc. %	551,6	512,4	593,6	618,8	635,6	641,2	655,2	650

Cette courbe, très voisine de la précédente, montre que le phénomène est réversible.

Ces expériences montrent que, pour des concentrations convenables en albumines cristallisées et en sulfate d'ammonium on observe, comme dans le cas des globulines, un maximum de solubilité pour une valeur déterminée du *pH*. Mais, dans le cas des albumines, le *pH* pour lequel la solubilité passe par un maximum, *n'est pas le pH du point iso-ionique des albumines*, il se situe au voisinage du point iso-ionique des pseudoglobulines.

Ce fait conduit à penser que les albumines cristallisées ne sont pas une espèce chimique, mais un mélange dans lequel entreraient des pseudoglobulines, ou tout au moins, que les albumines cristallisées et les pseudoglobulines renfermeraient une même substance, substance qui donnerait sa marque aux courbes de solubilité. Cette explication s'accorde d'ailleurs parfaitement avec des travaux récents de LESLIE F. HEWITT (1) qui isole une globuline à partir de l'albumine cristallisée du sérum. Cet auteur avait déjà séparé la sérum-albumine en deux fractions (2) et, des recherches immunologiques plus récentes, lui avaient fait entrevoir la présence de globulines dans la sérum-albumine (3). L'isole-

(1) LESLIE F., HEWITT, *Bioch. Journ.*, XII, 27 (1938).

(2) L. F. HEWITT, *Bioch. Journ.*, 31, 360, 1047, 1534 (1937).

(3) L. F. HEWITT, *Bioch. Journ.*, 30, 2229 (1936).

ment de globulines à partir d'albumines n'est pas, d'ailleurs un fait isolé et PALMER a préparé une globuline cristallisée à partir de la fraction albuminique du lait de vache (1).

Par des méthodes essentiellement différentes, SVEDBERG, TISÉLIUS, MUTZENBACHER arrivent à des conclusions analogues.

La question n'est pourtant pas encore tranchée : ADAIR, en particulier, arrive à des résultats opposés.

Étude des pseudoglobulines (2).

Il s'agit de la fraction protéidique du sérum précipitée par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et soluble dans l'eau distillée.

Dans nos expériences sur la solubilité des protéides sériques, nous nous sommes spécialement intéressés à cette fraction qui présente, au point de vue expérimental, des commodités particulières :

1° Sa solubilité dans l'eau distillée permet d'obtenir ce protéide dans un état de pureté impossible à réaliser avec les globulines.

2° Sa précipitation par des concentrations en sulfate de sodium relativement faibles (à partir de 17 p. 100 environ) permet d'étudier la solubilité en partant de mélanges parfaitement homogènes puisqu'il n'est pas nécessaire de dissoudre le sel directement dans la solution protéidique. Cette dissolution du sel dans la solution entraînerait, nous l'avons vu à propos des albumines (p. 51), de nombreuses causes d'erreur.

Ainsi, on peut obtenir avec les pseudoglobulines des résultats d'une précision beaucoup plus grande qu'avec les albumines et les globulines totales. Les pseudoglobulines sont donc, parmi les protéides du sérum, le matériel de choix pour atteindre le but que nous poursuivons dans ce travail, c'est-à-dire pour la recherche des lois générales qui régissent la dissolution des protéides.

(1) A. H. PALMER, *Journ. of Biol. Chem.*, 104, 359 (1934).

(2) Une partie de ces résultats a déjà été publiée : J. J. PÉREZ et G. SANDOR, *C. R. Acad. Sc.*, 206, p. 536 (1938).

Les pseudoglobulines ont été préparées comme nous l'avons indiqué au chapitre des techniques générales (p. 39), et l'étude de leur solubilité a été conduite en suivant exactement le « Protocole d'une expérience » : il est inutile d'y revenir.

On trouvera donc exclusivement dans ce chapitre des résultats expérimentaux.

Voici ces principaux résultats obtenus avec des solutions de pseudoglobulines rigoureusement pures :

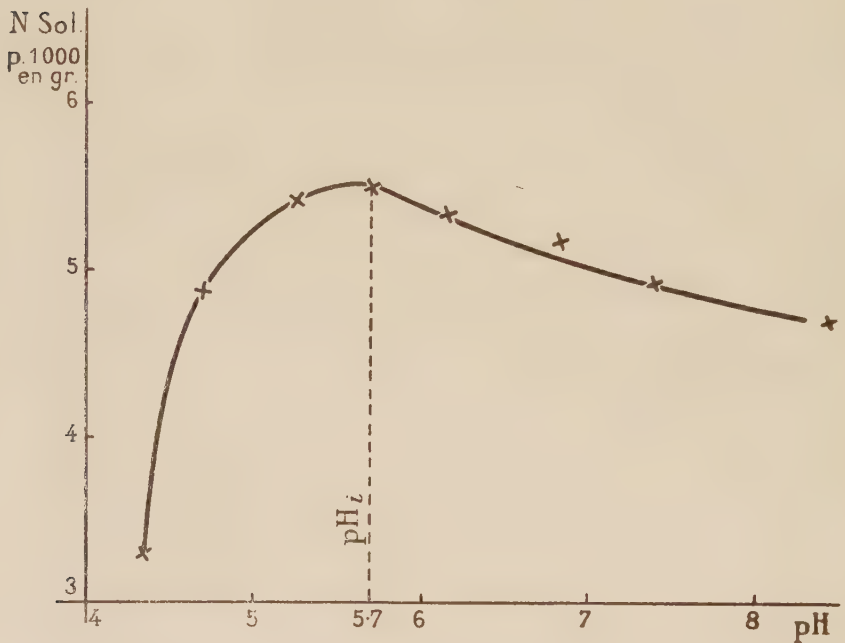


FIG. 6. — Solubilité des pseudoglobulines (sérum I).
(Durée de la précipitation : 10 minutes).

SÉRUM I (Figure 6).

Concentration en sulfate de sodium..... 12 %
 Concentration en protéides du mélange initial 4,14 %
 Concentration en azote du mélange initial... 0,657 %
 Point isoionique = 5,7.
 Durée de précipitation : 10 minutes.

<i>pH</i> de la solution	8,54	7,38	6,84	6,14	5,74	5,23	4,66	4,33
<i>N</i> soluble ‰.....	4,76	4,93	5,25	5,34	5,52	5,42	4,91	3,30

Il y a dans cette expérience une coïncidence très nette entre le point isoionique et le maximum de solubilité.

SÉRUM II (Figure 7).

Concentration en sulfate de sodium.....	12	%
Concentration en protéides du mélange initial	4,05	%
Concentration en azote du mélange initial.....	0,641	%

Point isoionique = 5,87.

Durée de précipitation : 10 minutes.

pH de la solution.....	8,28	7,44	6,44	6,04	6,0	5,6	5,2	4,28
N soluble ‰.....	4,30	4,38	5,01	5,48	5,54		5,25	3,29

La coïncidence est aussi marquée que dans l'expérience précédente.

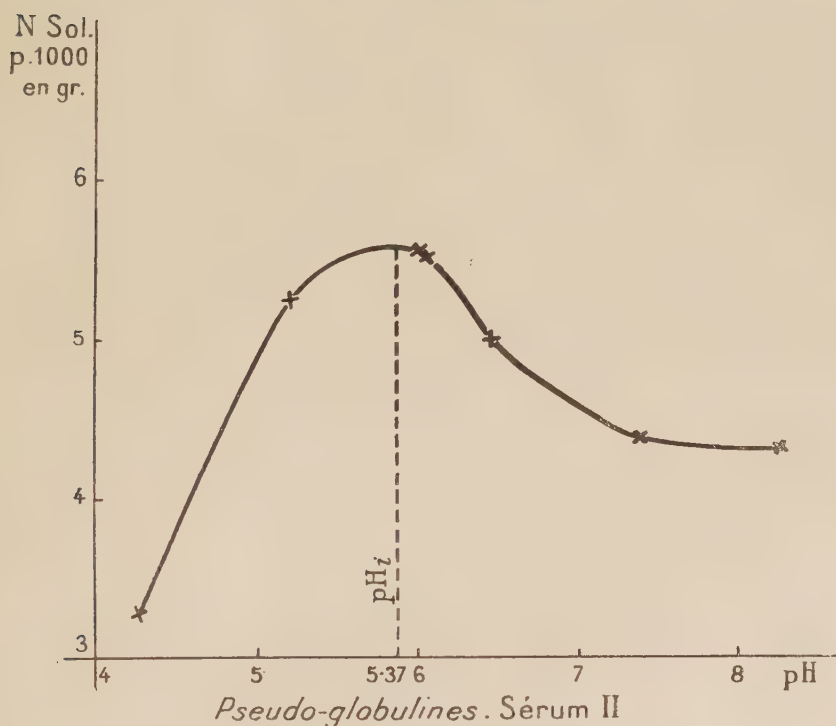


FIG 7. — Solubilité des pseudoglobulines (sérum II)
(Durée de la précipitation : 10 minutes).

SÉRUM III (Figure 8).

Concentration en sulfate de sodium.....	12	%
Concentration en protéides du mélange initial.....	3,29	%
Concentration en azote du mélange initial.....	0,505	%

Point isoionique = 5,9.

Durée de la précipitation : 16 heures.

<i>pH</i> de la solution.....	7,58	7,32	6,20	5,92	5,60	5,22	4,26
<i>N</i> soluble ‰	3,61	3,78	4,31	4,50	4,45	4,44	2,70

La durée de la précipitation n'a donc pas d'influence sur la valeur du *pH* pour laquelle la solubilité est maximum.

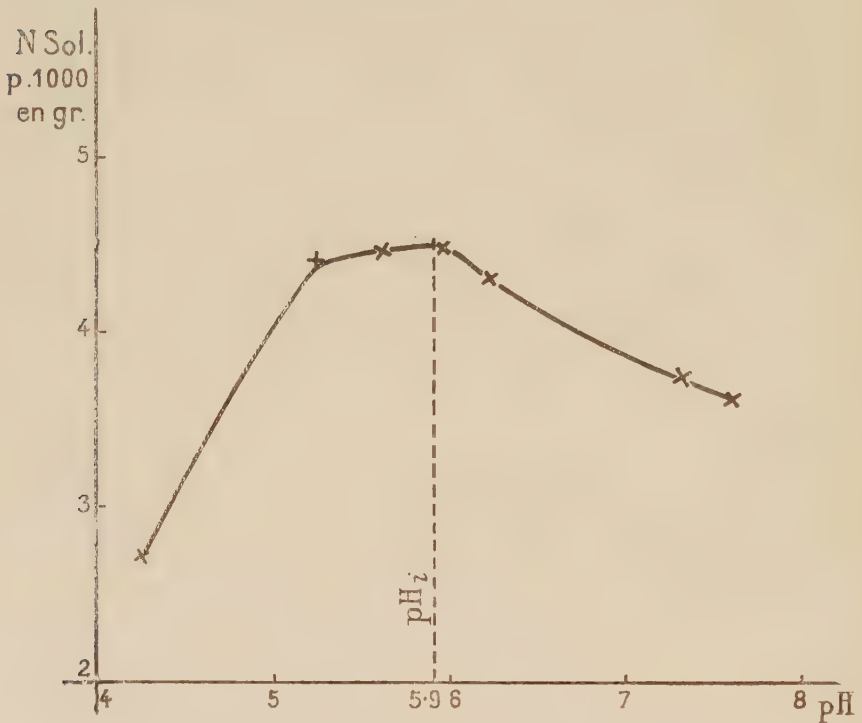


FIG. 8. — Solubilité des pseudoglobulines (sérum III)
(Durée de précipitation : 16 heures).

Dans les expériences qui précèdent, la concentration en sulfate de sodium était toujours la même ; on pourrait donc penser que la coïncidence entre le point isoionique et le maximum de solubilité n'existe que pour cette concentration et qu'elle est seulement l'effet du hasard. Il fallait, par suite, pour répondre à cette objection, étudier la solubilité à différentes concentrations en sulfate de sodium.

SÉRUM IV (Figure 9).

Concentration en protéides du mélange initial.....	3,62 %
Concentration en azote du mélange initial.....	0,574 %

Point isoionique = 5,85.

Durée de la précipitation : 1/2 heure.

1° Concentration en sulfate de sodium : 11,6 %.

pH de la solution.....	6,56	5,9	5,42	4,84
N soluble ‰.....	4,26	4,64	4,55	2,80

2° Concentration en sulfate de sodium : 14 %.

pH de la solution.....	6,56	5,9	5,42	4,84
N soluble ‰.....	2,47	2,91	2,75	1,27

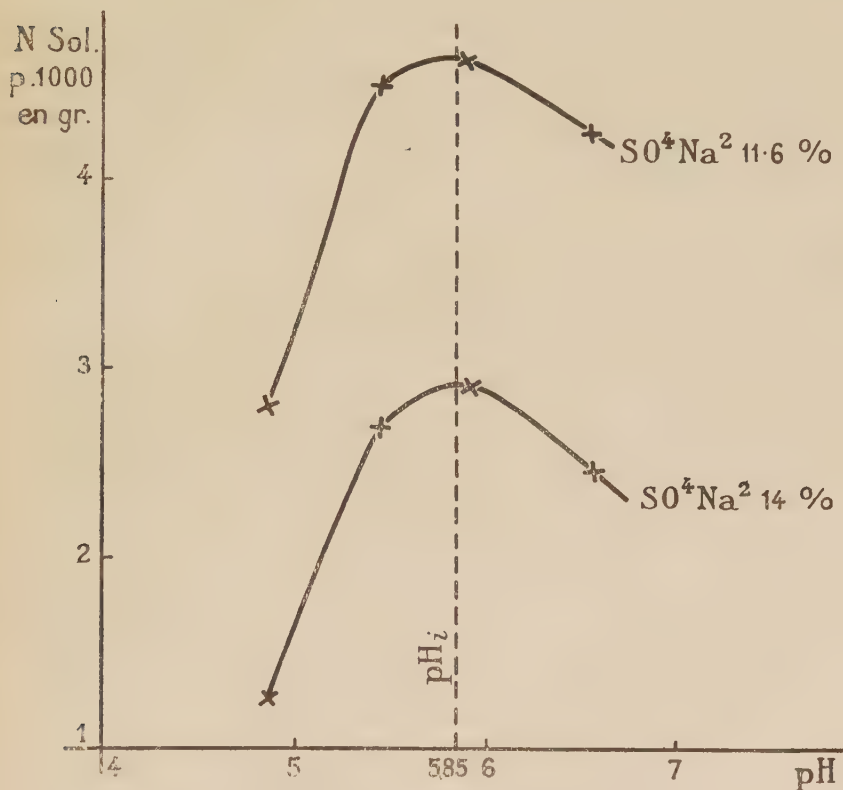


FIG. 9. — Solubilité des pseudoglobulines (sérum IV).
Influence de la concentration saline (durée de précipitation : 1/2 heure).

Ainsi, nous le voyons, la solubilité passe par un maximum au point isoionique pour des concentrations en sels neutres différentes. La seule différence entre les deux courbes de solubilité est que le protéide est moins soluble quand la concentration en sel est plus grande.

Résumé et discussion.

Dans la partie expérimentale de ce travail, nous avons étudié l'influence du *pH* sur la solubilité des protéides du sérum en présence de fortes concentrations salines et nous avons tracé des courbes montrant les variations de cette solubilité en fonction du *pH*.

De l'examen de ces courbes, il ressort très nettement :

- 1° que la solubilité des protéides sériques en présence de fortes concentrations salines évolue régulièrement en fonction du *pH* ;
- 2° que cette solubilité passe toujours par un maximum pour une valeur particulière du *pH* ;
- 3° la valeur du *pH* pour laquelle la solubilité du protéide passe par un maximum est celle du point isoïonique dans le cas des globulines et des pseudoglobulines ;
- 4° la solubilité des albumines passe par un maximum pour une valeur du *pH* qui n'est pas celle du point isoïonique des albumines ; mais paraît se situer plutôt au voisinage du point isoïonique des pseudoglobulines.

Ces résultats, surtout en ce qui concerne les globulines et les pseudoglobulines, sont en contradiction absolue avec l'opinion généralement admise. Suivant cette opinion, en effet, la solubilité des protéides — comme d'ailleurs la pression osmotique, la viscosité, l'aptitude au gonflement — passerait par un minimum au point isoélectrique. Or, c'est le fait inverse que nous avons observé. Avant donc de chercher à expliquer l'évolution de la solubilité des protéides sériques en fonction du *pH* telle que nous l'avons observée, il n'est pas inutile de préciser dans quelle mesure les travaux antérieurs et les nôtres sont en opposition.

A vrai dire, s'il est admis que les protéïdes présentent un minimum de solubilité au point isoélectrique — ou isoïonique — cette opinion n'est pas appuyée sur un grand nombre d'expériences et la plupart de celles auxquelles on se réfère ont trait à des mesures de solubilité en présence de faibles concentrations salines ou même en l'absence de sels. Nous avons d'ailleurs exposé ces expériences au début de ce travail (p. 17) et montré qu'elles n'étaient pas toujours à l'abri de critiques. Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus sur la solubilité des protéïdes en présence de très faibles concentrations salines ne sauraient nullement être opposés à ceux obtenus en présence de fortes concentrations : il n'y a aucune raison de supposer — bien au contraire — que la solubilité des protéïdes doive évoluer dans le même sens pour des concentrations salines faibles et élevées. Pour s'en convaincre, il suffit de se rappeler que des solutions salines diluées dissolvent des protéïdes qui seront précipités par des concentrations salines plus élevées en ces mêmes sels. C'est le cas, par exemple, de la globuline du sérum : ce protéïde, insoluble dans l'eau distillée, se dissout parfaitement dans des solutions aqueuses diluées de sulfate d'ammonium et est totalement précipité quand la concentration en ce sel atteint la demi-saturation. Il paraît donc inutile de comparer les travaux sur la solubilité des protéïdes à de faibles et à de fortes concentrations salines.

Les études expérimentales sur la solubilité des protéïdes en fonction du pH à des concentrations salines élevées sont assez rares — peut-être à cause des difficultés matérielles et de la longueur de ce genre d'études. Les seuls résultats qui paraissent en opposition formelle avec ceux qui ont été rapportés dans les pages précédentes sont ceux de SÖRENSEN sur l'ovalbumine cristallisée et ceux de GREEN sur la carboxyhémoglobine. *Ces auteurs, étudiant la solubilité de ces substances en présence de fortes concentrations salines, ont noté un minimum de solubilité au point isoélectrique.* Avant d'examiner leurs travaux, observons que ces auteurs travaillaient sur d'autres substances que les protéïdes sériques et qu'il n'y a aucune raison d'admettre *a priori* que le

comportement de tous les protéides naturels soit le même. Les molécules protéïdiques sont de complexité et, sans doute, de structure, si différentes qu'il n'y a vraiment aucune raison de penser que les résultats obtenus avec un protéide doivent être obligatoirement superposables à ceux obtenus avec un autre. C'est ainsi que nos résultats avec les albumines cristallisées et les globulines ou les pseudoglobulines ne sont pas identiques. Il est donc naturel de penser que le comportement de l'hémoglobine puisse être très différent de celui des protéides sériques. Enfin, les résultats d'expériences faites avec divers protéides ne devraient être comparés qu'autant que les conditions expérimentales sont comparables.

Ceci dit, les travaux de SÖRENSEN et de GREEN sont-ils en contradiction avec ceux que nous avons rapportés ? Plus exactement, leurs expériences et les nôtres peuvent-elles vraiment être comparées ? Nous avons déjà parlé des expériences de SÖRENSEN (1) sur l'ovalbumine cristallisée (p. 20). Ces expériences étaient fort bien conduites et la technique très voisine de celle que nous avons suivie. Il était cependant difficile d'en déduire une relation un peu précise entre la solubilité et le point isoélectrique de l'ovalbumine car SÖRENSEN n'étudiait l'influence du pH que dans des limites très étroites — comprises entre 4,42 et 5,30 — et il s'est contenté de mesurer trois ou quatre points. Ceci était tout à fait insuffisant pour permettre de savoir, même très approximativement, les variations de la solubilité en fonction du pH . GREEN (2), rapportant les travaux de SÖRENSEN, a donné, il est vrai, une courbe de solubilité de l'ovalbumine qui passe par un minimum à pH 4,5 ; mais cette courbe n'est pas la courbe expérimentale de SÖRENSEN : les points au-dessous de pH 4,5 n'ont pas été mesurés, mais calculés par GREEN en appliquant une formule de solubilité déjà employée par COHN (3). En résumé, si le travail de SÖRENSEN ne s'accorde

(1) S. P. L. SÖRENSEN, *C. R. Lab. Carlsberg*, vol. 18, n° 5, p. 1 (1930) et Margrethe SÖRENSEN, *C. R. Lab. Carls.*, 16, n° 12 (1927).

(2) GREEN, *Journ. Biol. Chem.*, 93, 517 (1931).

(3) $\log S = \beta - K'_{sp}$. E. J. COHN et A. A. GREEN, *Journ. of Biol. Chem.*, 78, 1928 ; *Scientific Proc.*, XXII, p. xxxii.

pas avec les phénomènes observés sur les protéides du sérum, ils ne sauraient néanmoins leur être opposés. Ajoutons, d'ailleurs, un fait sur lequel nous aurons à nous étendre plus longuement par la suite et qui diminue singulièrement la valeur des résultats de SÖRENSEN : cet auteur, pour faire varier le *pH* des solutions d'ovalbumine, ajoutait de l'acide sulfurique sans se préoccuper du changement de la concentration en ion sulfate qui en résultait. Par suite, le *pH* n'était pas la seule variable : la concentration en ion sulfate et la force ionique variaient aussi. Or la force ionique a une influence énorme sur la solubilité (1).

La courbe de solubilité de la carboxyhémoglobine en présence de concentrations élevées en phosphates telle qu'elle a été donnée par GREEN (2) présente un minimum de solubilité très net à *pH* 6,5, c'est-à-dire pour la valeur du point isoélectrique généralement attribué à cette substance. *Cette courbe est donc essentiellement différente de celles que nous avons tracées avec les globulines et les pseudoglobulines du sérum.* Mais les résultats de GREEN sont peut-être contestables et, en tout cas, il est difficile de les comparer avec les nôtres par suite de la différence des conditions expérimentales. A dire vrai, les courbes de GREEN ne sont pas la simple traduction de résultats expérimentaux. Dans les mélanges où GREEN déterminait la solubilité de la carboxyhémoglobine, la concentration en ion hydrogène n'était pas la seule variable : en réalité, tous les facteurs l'étaient. Le sel utilisé par GREEN étant un mélange tampon de phosphates, il faisait varier le *pH* en modifiant le rapport entre le phosphate monopotassique et le phosphate dipotassique et ceci entraînait à la fois une variation de la concentration saline et de la force ionique. Voici d'ailleurs quelques-uns des chiffres de GREEN :

Concentration en ion PO_4^{--}	1,908 M. à 0,922 M. par litre
Concentration en phosphate dipotassique..	0,274 M. à 0,850 M.
Force ionique	2,34 à 3,60.

(1) GREEN, *Journ. Biol. Chem.*, 95, 48, 1932.

(2) GREEN, note 2, p. 66.

De ces chiffres, on peut conclure que les expériences de GREEN ne permettaient pas de tracer des courbes de solubilité en fonction du *pH* puisque le *pH* n'était pas seul variable. En fait, la courbe de GREEN n'est pas une courbe expérimentale, elle a été établie à l'aide des considérations théoriques suivantes :

Dans une publication antérieure (1), GREEN avait montré que la solubilité d'un protéide en solutions salines concentrées pouvait s'exprimer par la relation :

$$\text{Log } S = \beta - K's\mu$$

équation dans laquelle *S* est la solubilité à la force ionique μ et β la valeur de *Log S* quand $\mu = 0$. Comme l'hémoglobine est dissoute par de faibles concentrations salines, alors qu'elle est précipitée par des concentrations élevées, la constante β a une signification purement hypothétique. Quant à *K's*, constante de précipitation saline, sa valeur numérique varie suivant la nature du protéide et du sel. *Pour l'hémoglobine en solution de phosphates, cette valeur serait indépendante de la température et du pH.* Puisque *K's* est indépendant du *pH*, GREEN en conclut que la variation de la solubilité avec la réaction est complètement définie par la variation de β . Finalement, il calcule les valeurs de β par l'équation précédente et c'est à partir de ces données qu'il établit la courbe de solubilité de la carboxyhémoglobine. Ainsi, les résultats de GREEN sont loin d'être des résultats expérimentaux et ils n'ont de valeur que dans la mesure où la formule utilisée est applicable au cas particulier considéré. Or, il paraît y avoir au moins une cause d'erreur dans l'application de cette formule : c'est de ne pas tenir compte de la contribution du protéide à la force ionique de la solution. En effet, puisque GREEN considère la carboxyhémoglobine comme un électrolyte, il n'y a aucune raison de négliger sa participation à la force ionique de la solution.

Peu après GREEN, SÖRENSEN (2) a publié un travail important sur l'hémoglobine. Ce travail, intéressant en lui-même,

(1) GREEN, *loc. cit.*, n° 1, p. 67.

(2) S. P. L. SÖRENSEN et M. SÖRENSEN, *C. R. Lab. Carlsberg*, 19, n° 11, p. 1 (1931-33).

l'est en outre pour la discussion de celui de GREEN que nous venons d'examiner et pour le rapprochement de ces résultats et des nôtres. SÖRENSEN a étudié la solubilité de la carboxy-hémoglobine en fonction du pH et pour de fortes concentrations en sulfate d'ammonium. Sa technique était identique à celle qu'il avait déjà utilisée pour l'ovalbumine cristallisée. SÖRENSEN, au contraire de GREEN, établit une véritable courbe expérimentale. Cette courbe présente bien un minimum de solubilité à pH 6,61 ; mais elle présente, en outre, un maximum à pH 5,88 et un nouveau minimum à pH 5,34. Pour SÖRENSEN, le premier minimum correspondrait au point isoélectrique puisqu'il se situe au voisinage du pH généralement attribué au point isoélectrique de l'hémoglobine ; le second minimum serait dû à la formation de sulfate de protéide peu soluble. Quoi qu'il en soit, GREEN décrivait une courbe de solubilité ayant un minimum, tandis que SÖRENSEN montre l'existence de deux minimums et d'un maximum — qui en est d'ailleurs très rapproché. GREEN et SÖRENSEN admettent que le minimum à pH 6,5 correspond au point isoélectrique ; mais le fait est très contestable (1). En effet, ces auteurs ne mesuraient pas le point isoélectrique de l'hémoglobine, mais ils se rapportaient à des mesures de ce point faites à des concentrations salines très différentes des leurs. Or, ADAIR et ADAIR (2) ont montré que ce point se déplaçait avec la force ionique. Avec l'hémoglobine de brebis, on voit le point isoélectrique passer de 7,45 à 7,16 et 6,70 quand la force ionique varie de 0,02 à 0,04 et 0,07. SMITH (3), dans un excellent travail, en utilisant des mélanges tampons de forces ioniques constantes (4), observe un déplacement analogue avec l'albumine d'œuf. Un autre fait signalé par ADAIR montre encore combien on peut douter que le minimum de solubilité donné par GREEN coïncide avec le point isoélectrique de

(1) Le point isoélectrique d'un protéide n'a pas toujours, en outre, une valeur rigoureusement déterminée. Suivant les auteurs, par exemple, le point isoélectrique de l'ovalbumine est compris entre 4,55 et 4,88.

(2) G. S. ADAIR et M. E. ADAIR, *Bioch. Jour.*, 28, 1280 (1934).

(3) E. SMITH, *Jour. Biol. Chem.*, 108, 187 (1935).

(4) Ces mélanges étaient réalisés en suivant une technique indiquée par GREEN, *Jour. of Amer. Chem. Soc.*, 55, 2331 (1933).

l'hémoglobine. ADAIR note, en effet, que le point isoélectrique se déplace de 0,45 *pH* vers la région acide quand la température varie de 0 à 25°. Or, COHN et PRENTISS (1) trouvent à 0° un minimum de solubilité pour le même *pH* que GREEN qui faisait ses déterminations à 25°. Il y a ici une contradiction évidente. Ajoutons que, si le point isoélectrique se déplace vers la région acide quand la température s'élève ou quand la force ionique augmente, par contre, toujours suivant ADAIR, le point isoionique serait invariable (2). En somme, l'ensemble de ces travaux est assez contradictoire et il paraît difficile d'y trouver une infirmation des résultats que nous avons obtenus sur les protéides du sérum. On pourrait même, dans ceux de SÖRENSEN, trouver une confirmation car il n'y a aucune raison d'admettre que ce ne soit pas le maximum de la courbe de SÖRENSEN qui coïncide avec le point isoélectrique plutôt que le minimum (3).

Nous avons comparé les travaux de SÖRENSEN et de GREEN et les résultats de l'un nous ont conduit à penser que ceux de l'autre pouvaient être mis en doute. Les expériences de SÖRENSEN ne sont cependant pas parfaites. Cet auteur a commis, en effet, une erreur que nous avons déjà signalée : il ne s'est pas préoccupé de maintenir la concentration en ion sulfate constante. Cette erreur pourrait paraître négligeable car la quantité d'ion sulfate apportée par l'acide sulfurique ajouté pour abaisser le *pH* est extrêmement petite par rapport à la quantité d'ion sulfate du sulfate d'ammonium. S'il s'agissait seulement d'une action de masse, cette addition d'ion sulfate serait, en effet, négligeable ; mais cette addition d'ion sulfate entraîne en même temps une modification de la force ionique qui, elle, n'est pas négligeable. Dans les expériences de SÖRENSEN, pour 100 cm³ de la solution, il y avait, suivant les cas, de 0 à 25 cm³ d'acide sulfurique dixième

(1) COHN et PRENTISS, *Jour. of Gen. Phys.*, 8, 619 (1925-27).

(2) ADAIR et ADAIR mesuraient le point isoionique par des mesures de potentiel de membrane. Leurs conclusions étaient peut-être d'ailleurs un peu prématurées.

(3) ADAIR et ADAIR observent, comme nous l'avons dit, un déplacement du point isoélectrique avec la force ionique alors que le point isoionique resterait invariable. Le minimum de pression osmotique se situerait, selon eux, entre le point isoionique et la nouvelle valeur du point isoélectrique.

normal, ce qui entraînait un écart de force ionique de 0,0375 (1). Cette différence est loin d'être négligeable comme le montrent des courbes de GREEN (2) qui donnent les variations du logarithme de la solubilité de divers protéides en fonction de la force ionique. La courbe de solubilité de l'hémoglobine de SÖRENSEN, quoique plus complète que celle de GREEN, ne peut pas néanmoins être considérée comme donnant les variations de la solubilité en fonction du seul pH , puisque la force ionique était également variable. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que cette courbe de solubilité de l'hémoglobine ressemble à celle que nous avons obtenue avec BONNEFOI et SANDOR (3) dans des expériences où nous déterminions l'influence du pH sur la solubilité des protéides sans maintenir la force ionique constante. Nous avons alors observé, comme SÖRENSEN, deux accidents dans les courbes de solubilité et cette constatation, qui nous avait fait supposer l'existence d'un mélange, avait été le point de départ de nos études sur la solubilité des protéides sériques.

En résumé, ni les travaux de GREEN, ni ceux de SÖRENSEN ne permettent d'affirmer que, contrairement à ce que nous avons observé, la solubilité des protéides, en présence de fortes concentrations salines, doive passer par un minimum au point isoionique. En dehors du fait que les substances étudiées par ces auteurs étaient différentes des nôtres, les conditions expérimentales n'étaient nullement comparables et n'étaient pas, au surplus, à l'abri de critiques. En particulier, les courbes de GREEN n'étaient pas la simple représentation de résultats expérimentaux et, en tout cas, l'influence du pH n'était déterminée que dans une zone très étroite sans que l'auteur ait vérifié que le minimum de solubilité coïncidait bien réellement avec le point isoélectrique — ou isoionique — de la substance dans les conditions expé-

(1) Rappelons que la force ionique est égale à $\sum \frac{1}{2} C_i V^2$ où C_i est la concentration ionique en molalité (molécule gr. ou ion gr. pour 1.000 gr. de solvant) et V la valence de l'ion considéré.

(2) GREEN, *loc. cit.*, note 1, p. 67.

(3) SANDOR, BONNEFOI et PÉREZ, *C. R. Ac. Sc.*, 197, 1254 (1933).

rimentales où il se plaçait. Quant à SÖRENSEN, il observait à la fois deux minimums et un maximum (1), sans que l'on puisse préciser que le point isoélectrique coïncidât avec l'un des minimums ou avec le maximum. Enfin, SÖRENSEN négligeait l'influence des variations de la force ionique dues aux additions d'acide sulfurique et cette influence peut être considérable.

Dans nos études sur la solubilité, rappelons que le point isoionique était mesuré directement sur la substance étudiée, que la concentration en ion sulfate était rigoureusement constante et que la force ionique — sauf pour un point extrême de la courbe où elle variait d'une quantité infime — était également constante.

L'interprétation des courbes de solubilité des protéides sériques en fonction du *pH* est difficile — au moins dans l'état actuel de la question. Pour pouvoir expliquer les faits expérimentaux, il faudrait connaître avec exactitude tous les paramètres qui interviennent dans le phénomène et, pour que l'explication soit générale, il faudrait connaître, en outre, le comportement d'un très grand nombre de protéides et non pas seulement celui des protéides sériques et de l'hémoglobine. Si, cependant, on veut chercher à expliquer les faits observés, on sera contraint de formuler des hypothèses qui ne pourront prétendre être l'expression de la réalité et dont le rôle sera simplement celui d'un instrument de travail.

L'hypothèse la plus simple qu'on puisse envisager pour expliquer l'existence d'un maximum de solubilité au point isoionique — comme d'ailleurs d'un minimum de solubilité — consiste à admettre que le protéide formerait avec l'anion ou le cation du sel neutre des complexes plus ou moins solubles. Dans ce cas, le sulfate d'ammonium précipiterait le protéide parce que les sulfates de protéides sont des sels peu solubles, ils précipitent donc quand on fait diminuer leur dissociation soit par addition d'anion sulfate, soit par

(1) Dans une de ses expériences, SÖRENSEN notait un troisième minimum. Ce point aberrant montre la difficulté de ce genre d'études.

addition de cation hydrogène. Cette hypothèse n'est d'ailleurs pas nouvelle : elle fut émise pour la première fois par MICHAËLIS et c'est elle que nous avons d'abord envisagée (1).

Actuellement, il nous paraît cependant qu'il y aurait intérêt à accepter une autre hypothèse — hypothèse suivant laquelle les sels protéidiques devraient être considérés comme des électrolytes forts. On sait, en effet, qu'on peut classer les électrolytes en deux catégories : les électrolytes faibles et les électrolytes forts. Cette distinction repose simplement sur des différences de conductibilité ; elle n'est pas arbitraire, car la nature nous offre des électrolytes faibles et forts sans intermédiaires. On admet que les électrolytes forts sont complètement dissociés en leurs ions et, pour que les lois des solutions leur soient applicables, — loi d'action de masse, lois de la pression osmotique — il faut remplacer, dans les formules, les concentrations par un nouveau facteur appelé par LEWIS l'« *activité* ». Les protéides sont généralement considérés comme des électrolytes faibles ; mais il semble que les sels protéidiques d'anions ou de cations forts devraient être considérés comme des électrolytes forts. Cette hypothèse paraît assez naturelle si on se rappelle que les carboxylates de cations forts et les sels ammoniacaux d'anions forts sont eux-mêmes des électrolytes forts. En effet, les différences électrochimiques qui peuvent exister entre un carboxylate simple — un acétate, par exemple — et le sel de la fonction carboxylique d'un protéide ou celles qui peuvent exister entre un sel ammoniacal et le sel de la fonction amine primaire d'un protéide paraissent, *a priori*, ne pouvoir être très importantes. Si donc, les carboxylates simples et les sels ammoniacaux d'anions forts sont des électrolytes forts, par analogie, on peut penser que les sels protéidiques d'anions ou de cations forts sont également des électrolytes forts.

Mais, si on admet que les sels protéidiques sont des électrolytes forts, il en résulte qu'il faut faire intervenir, dans l'étude des propriétés de leurs solutions, non pas leur concentration, mais leur activité. C'est d'ailleurs ce qu'ont déjà fait

(1) SANDOR, BONNEFOI et PÉREZ, *C. R. Ac. Sc.*, 197, 1254 (1933).

différents auteurs, en particulier SÖRENSEN, COHN et GREEN. Les résultats qu'ils ont obtenus ne peuvent qu'encourager dans cette voie.

Nous avons déjà vu (1) que ces auteurs avaient été conduits à une formule donnant la solubilité de divers protéides à température et à *pH* constants. Cette formule reproduit fidèlement l'équation simplifiée de DEBYE-HÜCKEL (2) donnant la solubilité d'un ion quelconque ne formant pas de combinaison chimique avec les électrolytes minéraux forts de la solution. L'application de cette formule aux protéides sériques est-elle possible ? et pourrait-elle donner l'explication des variations de la solubilité en fonction du *pH* ? Les constantes du phénomène ne sont pas assez précisément fixées pour que cela soit actuellement possible. Mais il n'est peut-être pas inutile de remarquer que ces formules donnent la solubilité en fonction de la force ionique. Or, les auteurs n'ont jamais envisagé que la force ionique due au sel. Pourtant, si on admet que les sels protéidiques d'anions ou de cations forts sont des électrolytes forts, il semblerait logique de tenir compte également de leur contribution à la force ionique des solutions. Mais, si dans les conditions expérimentales où nous nous étions placés, il était facile de calculer la force ionique due au sel — qui était d'ailleurs constante — il était impossible de calculer celle due au protéide lui-même. Une chose toutefois paraît certaine, c'est que la contribution du protéide à la force ionique de la solution est variable. Cette force ionique dépend, en effet, du degré d'ionisation et de la grandeur moléculaire du protéide. Or, l'ionisation et la grandeur moléculaire du protéide varient sûrement avec le *pH*. Il semble probable, en particulier, que ces deux grandeurs passent par un minimum au point isoionique (3).

En somme, la variation de la solubilité d'un protéide en fonction du *pH* est un phénomène très complexe qui paraît

(1) Cf. p. 14.

(2) Cf. p. 15.

(3) De part et d'autre du point isoionique, le protéide est ionisé tandis qu'au point isoionique il est sous forme de zwitterion ou de molécule neutre et, dans les deux cas, la force ionique du protéide ne paraît pas pouvoir être la même à l'état neutre et à l'état d'ion.

dépendre, notamment, de la contribution du protéide à la force ionique de la solution. Il ne semble donc pas que l'on puisse tenter d'expliquer le phénomène avant d'avoir déterminé la grandeur et l'importance des variations de la contribution du protéide à la force ionique des solutions.

Dans les pages précédentes, nous n'avons considéré que le cas des globulines et des pseudoglobulines, nous n'avons pas parlé des albumines quoique nos mesures de solubilité aient porté également sur cette fraction protéidique. C'est que les faits observés avec ces substances sont, malheureusement, beaucoup moins nets. Tantôt on n'observe pas de maximum de solubilité, tantôt on observe un maximum mais il se situe assez loin du pont isoïonique des albumines et coïncide plutôt, approximativement, avec le point isoïonique des pseudoglobulines. Il faut rechercher, sans doute, l'explication de ces différences dans le fait que les albumines seraient des substances moins pures que les globulines et, surtout, que les pseudoglobulines.

SÖRENSEN a d'ailleurs étudié tout particulièrement les pseudoglobulines parce qu'il les considérait comme des substances beaucoup plus pures que les albumines. Il est même permis de penser que les pseudoglobulines sont de véritables espèces chimiques (1). Par contre, nous avons eu l'occasion de signaler que HEWITT isolait des globulines à partir de la sérum-albumine cristallisée et la présence de lipides n'est pas impossible non plus. En résumé, on peut penser que les albumines sont des mélanges trop complexes pour que les variations de leur solubilité en fonction du *pH* se traduise par un phénomène simple ou bien qu'elles renferment une forte proportion de pseudoglobulines et que ces pseudoglobulines donnent leur marque aux courbes de solubilité.

(1) L'examen de nombreuses courbes de solubilité et de titrage de pseudoglobulines, nous a également conduit à penser que ces substances étaient constituées, au moins pour la plus grande partie, par une espèce chimique définie.



DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Rôle des groupements sulfhydrilés
dans l'activation des enzymes.

Vu et approuvé :

Paris, le 22 avril 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G ROUSSY.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
APERÇU HISTORIQUE :	
Influence des sels neutres sur la solubilité.....	5
Influence du pH sur la solubilité.....	17
TRAVAUX PERSONNELS :	
Techniques générales.....	22
Préparation du matériel :	
A. Globulines.....	23
B. Pseudoglobulines.....	24
C. Albumines.....	24
D. Albumines cristallisées.....	24
Dialyse.....	25
Dosages d'azote.....	28
Mesure des pH et courbes de titrage	32
Point isoïonique.....	34
Etude de la solubilité.....	37
Protocole d'une expérience.....	42
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX :	
Etude des globulines.....	46
Etude des albumines.....	51
Etude des pseudoglobulines.....	59
RÉSUMÉ ET DISCUSSION.....	64
CONCLUSION	76

